

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Microbiologie Appliquée



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de quelques propriétés probiotiques de
souches de bactéries lactiques locales**

Présenté par :

HAMMACHE Amir & YETTOU Fouad

Soutenu le : **23 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme.	FARRADJI-HAMMA S.	MCA	Présidente
Mr.	BENDJEDDOU K.	MCB	Encadreur
Mme.	IDRES N.	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Dédicace :

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents, sur qui j'ai toujours pu compter et qui m'ont conseillé et soutenu afin que j'arrive à ce que je suis à présent.

Ma sœur Fella, à qui je souhaite bon courage et bonne chance sur la lancée qu'elle entretient dans son parcours universitaire.

Tous les membres de ma famille, notamment mes oncles et mes tantes, mes cousins, et mes cousines.

Mes défunts grands-parents Moussa, Taous, et Ahmed (que Dieu les accueille dans son vaste paradis), et ma grand-mère Malika (que Dieu la préserve et la garde).

Mon meilleur ami Fouad.

Toute la promotion de Master 2 Microbiologie Appliquée, et particulièrement mes deux camarades Katia et Sonia.

Toute personne que j'ai omis de mentionner et qui se reconnaîtra comme étant à mes yeux, de bonne et meilleur(e) compagnie.

Amir

Dédicace

J'ai l'honneur et le grand plaisir de dédier ce modeste travail à :

A ma Mère,

“Tu m’a donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.

Tout ce que je peux t’offrir ne pourra exprimer l’amour et la reconnaissance que je te porte.

En témoignage, je t’offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et pour l’affection dont tu m’as toujours entourée, que Dieu te protège.”

A mon Père,

“L’épaule solide, l’œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Dieu ne me prive pas de toi.”

*A mon frère **Merwan**,*

*A ma sœur **Siham**,*

*A ma chérie **Sonia**,*

*A tous mes cousins : **Yacine, Toufik, Mourad, Malek, Hamza, Fares, Riadh, Yazid.***

*A mon camarade **Amir**,*

*A mes ami(e)s : **Mourad, Malek, Ntchaida, Tchana, Zakia, Khadidja...***

A toute la promotion de Master 2 Microbiologie Appliquée 2017/2018.

Fouad

Remerciements

Nous remercions le bon Dieu, qui nous a facilité le chemin pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciements en particulier à :

Mr. BENDJEDDOU, notre promoteur pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de diriger ce travail et de nous avoir fait bénéficier de son expérience.

Mme FARRADJI pour sa gentillesse et d'avoir accepté de présider ce jury.

Mme Idres pour sa gentillesse et d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos vifs remerciements vont également à :

L'ensemble des techniciennes du laboratoire de microbiologie pour leur soutien inestimable le long de notre travail.

Toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre	page
Tableau I	Exemples d'espèces et de souches microbiennes utilisées comme probiotiques	07
Tableau II	Appareillage et matériel utilisé	14
Tableau III	Les souches de bactéries lactiques étudiées	15

Liste des tableaux en annexe

Numéro du tableau	Titre
Tableau I	Résultats du test des spots
Tableau II	Résultats du test des puits
Tableau III	Résultats du test de l'effet du pH
Tableau IV	Résultats du test de l'effet des sels biliaries
Tableau V	Résultats du test de l'effet de la Trypsine
Tableau VI	Résultats du test de l'effet de la pepsine

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre	Page
Figure 1	Groupes phylogénétiques majeurs et principaux genres des bactéries lactiques	04
Figure 2	Repiquage des souches de bactéries lactiques	16
Figure 3	Test des spots des souches de bactéries lactiques contre <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i>	18
Figure 4	Test des puits des souches de bactéries lactiques contre <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i>	20
Figure 5	Etude de l'effet du pH sur les souches de bactéries lactiques	22
Figure 6	Etude de l'effet des sels biliaires sur les souches de bactéries lactiques	24
Figure 7	Etude de l'effet des enzymes digestives sur les souches de bactéries lactiques	26
Figure 8	Activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques à l'égard d' <i>E. coli</i> .	27
Figure 9	Activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques à l'égard d' <i>E. coli</i> .	28
Figure 10	Activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques à l'égard de <i>S. aureus</i> .	28
Figure 11	Activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques à l'égard de <i>S.aureus</i>	29
Figure 12	Activité antibactérienne des surnageants de culture des souches de bactéries lactiques à l'égard d' <i>E. coli</i> .	30
Figure 13	Activité antibactérienne des surnageants des souches de bactéries lactiques à l'égard d' <i>E. coli</i> .	30
Figure 14	Activité antibactérienne des surnageants de culture des souches de bactéries lactiques à l'égard de <i>S.aureus</i> .	31
Figure 15	Activité antibactérienne des surnageants des souches de bactéries lactiques à l'égard de <i>S. aureus</i>	31
Figure 16	Effet du pH 3 et du pH 4 sur quelques souches de bactéries lactiques	34
Figure 17	Effet des sels biliaires sur les souches de bactéries lactiques	36
Figure 18	Effet de la Trypsine et de la Pepsine sur la souche 19.	38

Liste des abréviations

FAO : Food and Agriculture Organization

WHO : World Health Organization

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

MRS : de Man, Rogosa, et Sharpe

Lb. : *Lactobacillus*

St. : *Streptococcus*

Lc. : *Lactococcus*

Ec. : *Enterococcus*

Bf. : *Bifidobacterium*

BL : Bactérie Lactique

LAB : *Lactic Acid Bacteria*

BSH : *Bile Salt Hydrolase*

Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	01

Synthèse bibliographique

I. Les bactéries lactiques.....	03
I.1.Définition et caractéristiques.....	03
I.2.Taxonomie et classification.....	03
I.3.Applications des bactéries lactiques.....	05
II. Les probiotiques.....	05
II.1.Historique et définitions.....	05
II.2.Effets bénéfiques des probiotiques.....	06
II.3.Quelques microorganismes utilisés comme probiotiques.....	07
II.4.Critères de sélection des souches probiotiques.....	08
II.4.1.Critères de sécurité.....	08
II.4.2.Critères fonctionnels.....	09
II.4.3.Critères technologiques.....	12

Matériel et Méthodes

I. Matériel.....	14
I.1.Matériel et appareillage.....	14
I.2.Milieus de culture.....	14
I.3.Origine des souches.....	15

II. Méthodes.....	16
II.1. Revivification des souches.....	16
II.2. Tests d'activité antibactérienne.....	17
II.2.1. Test des spots.....	17
II.2.2. Test des puits.....	19
II.3. Effet du pH sur les souches de bactéries lactiques.....	21
II.4. Effet des sels biliaires sur les souches de bactéries lactiques.....	23
II.5. Etude de l'effet des enzymes digestives sur les souches de bactéries lactiques.....	25

Résultats et discussion

I. Tests d'activité antibactérienne.....	27
I.1. Test des spots.....	27
I.2. Test des puits.....	29
II. Effet du pH.....	33
III. Effet des sels biliaires.....	35
IV. Effet des enzymes digestives.....	37
Conclusion.....	40
Références bibliographiques.....	41
Annexes	
Résumé	



Introduction

Introduction

INTRODUCTION

Les probiotiques sont définis comme étant des microorganismes vivants qui une fois ingérés en quantités adéquates exercent des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte (**FAO/WHO, 2001**). Ces effets positifs sont le soulagement des maladies d'origine digestive (comme l'intolérance au lactose), l'amélioration du transit intestinal, et la prévention de certaines maladies comme l'augmentation du taux de cholestérol dans le sang, les diarrhées, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), le cancer du côlon, ainsi que d'autres infections d'origine microbienne (infections à *Clostridium difficile* et à *Campylobacter*), ils peuvent également modifier le microbiote intestinal par activité antimicrobienne, entrer en compétition pour les nutriments et pour les sites d'adhésion (**Rastall et al., 2005**), et stimuler et/ou moduler le système immunitaire (**Alegre, 2009**).

En plus des nombreux effets exercés par les probiotiques, il y a des propriétés fonctionnelles, dont on cite l'activité antimicrobienne (**Reis et al., 2012**), et la survie aux conditions du tube digestif à savoir l'acidité de l'estomac (**Yateem et al., 2008**), les sels biliaires produits dans le duodénum (**Ding et Shah, 2007**), et les enzymes digestives (**Daniel et al., 2006**).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes présentant des caractéristiques morphologiques, physiologiques, et métaboliques variées (**Dridier et Prévost, 2009**). On les trouve essentiellement dans les produits laitiers, mais aussi dans d'autres niches écologiques en étant seules ou en association avec d'autres microorganismes bénéfiques comme les levures (**Novel, 1993**). Elles sont utilisées de différentes manières, on cite les ferments ou les starters de fermentation (**Mugula et al., 2003**), les agents de bioconservation (**Vermeiren et al., 2004**), et les probiotiques (**Fuller, 1989**).

Dans le présent travail, l'objectif est d'étudier les propriétés probiotiques de souches de bactéries lactiques isolées à partir d'un fromage « **Alatig** » fabriqué artisanalement.

Introduction

Le travail réalisé sera axé sur les parties suivantes :

- une synthèse de la bibliographie dans laquelle les notions de base à connaître sur le sujet sont exposées.
- une partie matériel et méthodes dans laquelle sont énumérés et expliqués les protocoles expérimentaux suivis et le matériel utilisé.
- une partie résultats et discussion dans laquelle les résultats obtenus seront présentés.



*Synthèse
Bibliographique*

Synthèse Bibliographique

I. Les bactéries lactiques

I.1. Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes hétérotrophes à Gram positif, catalase négative, oxydase négative, nitrate réductase négative, anaérobies facultatifs, acidotolérantes, et mésophiles. Elles sont de formes variables : *cocci*, ou bacilles, immobiles et asporulées, elles peuvent fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique à plus de 50% (König et al., 2009). Elles sont auxotrophes à certains facteurs de croissance : acides aminés (Letort et Julliard, 2001), vitamines (Shankman et al., 1946), et bases azotées (Ives et Ikeda, 1997).

Les bactéries lactiques ont un métabolisme strictement fermentaire, elles sont classées en bactéries homofermentaires qui produisent uniquement l'acide lactique, et bactéries hétérofermentaires qui produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO₂ et/ou de l'éthanol (Pilet et al., 2005).

Ce sont des microorganismes ubiquistes qu'on trouve dans différentes niches écologiques, comme les produits laitiers, les végétaux, les muqueuses humaines et animales, le vin, la bière, et le pain en association avec les levures. (Novel, 1993).

I.2. Taxonomie et classification

Du point de vue phylogénétique, les bactéries lactiques appartiennent à la branche des *Clostridia* (Stiles et Holzappel, 1997). Elles sont classées dans le phylum des *Firmicutes*, la classe des *Bacilli*, l'ordre des *Lactobacillales*. Ce groupe englobe plusieurs familles : *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, et *Leuconostocaceae*.

Synthèse Bibliographique

La nouvelle classification et les principaux genres de bactéries lactiques sont illustrés dans la **figure 1** :

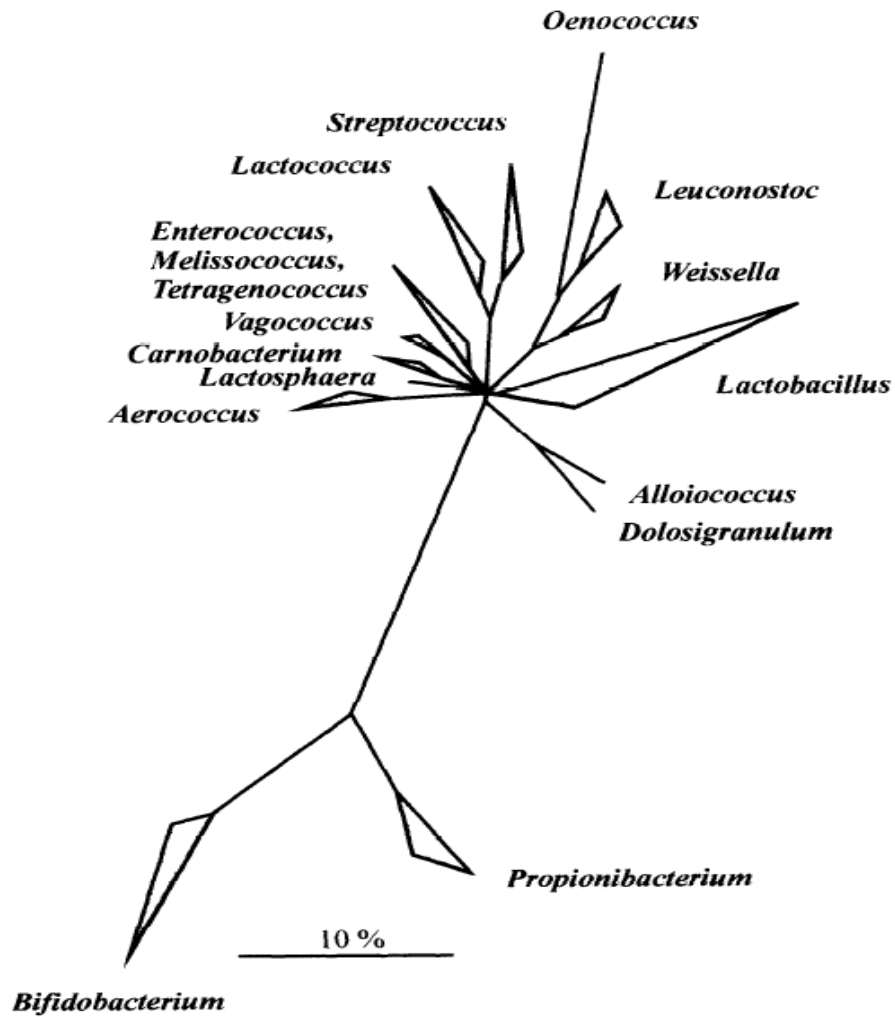


Figure 1 : Groupes phylogénétiques majeurs et principaux genres des bactéries lactiques (Stiles et Holzapfel, 1997)

Le genre *Bifidobacterium*, malgré sa distance phylogénétique vis-à-vis des autres genres (GC%>50%) a été inclus parmi les bactéries lactiques car il se présentait dans les mêmes niches écologiques et avait un métabolisme semblable à celui des bactéries lactiques (Stiles et Holzapfel, 1997).

Synthèse Bibliographique

I.3.Applications des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes utilisés de diverses façons, dont on cite les principales :

- Les ferments ou starters de fermentation: Les bactéries lactiques peuvent être utilisées seules ou associées à des levures dans la fermentation d'aliments divers comme le lait, les produits laitiers, et certaines plantes. **(Mugula et al., 2003)**.
- Les bioconservateurs: les bactéries lactiques sont capables de produire des métabolites et composés doués d'activité antimicrobienne, elles peuvent agir sur les microorganismes pathogènes et/ou d'altération et contribuer à prolonger la durée de vie des aliments. **(Gálvez et al., 2007)**.
- Les probiotiques: une autre utilisation des bactéries lactiques, qui grâce à leurs propriétés fonctionnelles (telles que la production de composés antimicrobiens et la capacité d'adhésion) peuvent avoir des rôles bénéfiques sur la santé humaine et animale. **(Fuller, 1989)**

II. Les probiotiques

II.1.Historique et définitions

La notion de « probiotique » a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff en 1907, il avait émis l'hypothèse que la bonne santé et la longévité des paysans bulgares étaient dues à leur consommation de laits fermentés. Il a alors proposé l'ingestion des bactéries lactiques pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, donc augmenter l'espérance de vie **(Anukam et Reid, 2007)**.

Le terme « probiotiques » a été introduit en 1965 par Lilly et Stillwell, la définition qu'ils ont formulé a été : «facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes ». En 1974, Parker élargit cette définition à « des organismes et substances contribuant à l'équilibre de la flore intestinale » Ce fut ensuite Fuller qui a redéfini les probiotiques comme étant « des préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additifs alimentaires et ayant une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale ». Aujourd'hui, selon la définition adoptée par la FAO et l'OMS, les probiotiques sont « des microorganismes vivants qui, une fois administrés en quantité adéquate, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte » **(Anukam et Reid, 2007)**

II.2.Effets bénéfiques des probiotiques

Les microorganismes probiotiques jouent plusieurs rôles bénéfiques quand ils atteignent l'intestin, ces effets sont résumés comme suit :

- **Activité enzymatique**

En produisant de nombreuses enzymes, les probiotiques permettent d'améliorer significativement la digestion et l'absorption intestinales, notamment chez des sujets présentant un déficit enzymatique. Les deux effets les plus évidents sont l'amélioration de la digestion du lactose (De Vrese et al., 2001), et l'amélioration de la digestion du saccharose (Harms et al., 1987).

- **Amélioration de la motricité et du transit intestinal**

Les probiotiques contribuent à accélérer la vitesse de digestion dans le côlon et aider à prévenir contre la constipation (Marteau et al., 2002).

- **Modification du microbiote intestinal**

Les probiotiques peuvent inhiber le développement des pathogènes, différents mécanismes sont impliqués :

- a- La compétition pour les nutriments**

L'inhibition de la croissance des pathogènes peut aussi s'effectuer par un processus de restriction des nutriments. Les probiotiques entrent en compétition avec les pathogènes en utilisant les mêmes substrats présents dans la lumière intestinale. La baisse de quantité des substrats disponibles rend donc l'environnement peu favorable à la croissance des pathogènes (Wealleans et Litten-Brown, 2010).

- b- La compétition pour l'adhésion**

La compétition pour les sites d'adhésion à la muqueuse intestinale est réalisée par les bactéries dotées de la capacité de formation de biofilms positifs comme les espèces des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* et certaines espèces d'*Enterococcus*. Ces espèces contribuent à bloquer l'accès des pathogènes aux sites d'adhésion et exercent un effet barrière (Rastall et al., 2005).

Synthèse Bibliographique

• Prévention de certaines maladies

Les probiotiques peuvent aider à traiter ou prévenir contre plusieurs maladies d'origine digestive, on cite comme exemples :

- L'augmentation du taux de cholestérol dans le sang (**Gilliland, 1990**)
- La diarrhée : aiguë infectieuse (**Klotz, 2001**), diarrhée du voyageur (**Carré et al., 2005**), ou diarrhées due à des antibiotiques.
- Le syndrome de l'intestin irritable. (**Ducrotté, 2011**)
- Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). (**Guslandi et al., 2000 ; Bousvaros et al., 2005**)
- Le cancer du côlon. (**Commane et al., 2005**)
- Infections bactériennes à *Clostridium difficile*. (**Surawicz, 2003**)
- Infections vaginales et infections urinaires (Chez les femmes) (**Reid et Bruce, 2005 ; Bergogne-Berezin, 2007**).

II.3. Quelques microorganismes utilisés comme probiotiques

Les microorganismes les plus souvent utilisés comme probiotiques sont des bactéries lactiques (genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, et *Bifidobacterium*), des bactéries non lactiques (*Escherichia coli* Nissle 1917, *Bacillus*), et des levures (*Saccharomyces*). Le Tableau I énumère des exemples de souches probiotiques :

Tableau I : Exemples d'espèces et de souches microbiennes utilisées comme probiotiques

Genre	Souches probiotiques
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota (Koebnick et al., 2003). <i>Lactobacillus plantarum</i> 299 (Pathmakantham et al., 2004). <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v (Schultz et al., 2002). <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (Salminen et al., 2004). <i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC533 (Pridmore et al., 2003).
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> 1131 (Sasaki et al., 2014).
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i> SF 68 (Benyacoub et al., 2003). <i>Enterococcus faecalis</i> UGRA10 (Cebrián et al., 2012).
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN173010 (Marteau et al., 2002). <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 (Mohan et al., 2006).

Synthèse Bibliographique

	<i>Bifidobacterium breve</i> UCC2003 (Sheehan et al., 2007). <i>Bifidobacterium lactis</i> HNO19 (Chiang et al., 2000). <i>Bifidobacterium infantis</i> 35264 (Brenner et Chey, 2009).
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i> (Bhunja et al., 1988).
Bactéries non lactiques	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (Schlee et al., 2007). <i>Bacillus subtilis</i> UTM126 (Balcázar et Luna, 2007).
Levures	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces boulardii</i> (Edwards-Ingram et al., 2007).

II.4. Critères de Sélection des souches probiotiques

Les effets bénéfiques des probiotiques sont réalisés dans l'intestin, et pour arriver à accomplir ces effets, les potentiels microorganismes probiotiques doivent satisfaire aux critères suivants :

II.4.1. Critères de sécurité

Des principes généraux et des critères pratiques ont été mis en place *in vitro* pour sélectionner les souches probiotiques les plus sécuritaires, ces critères sont les suivants :

a- identification des souches

Les souches probiotiques doivent être identifiées par des méthodes moléculaires fiables de détermination du phénotype et du génotype (Vasiljevic et Shah, 2008). Et une fois identifiées, les souches probiotiques doivent être déposées dans une collection de cultures reconnue à l'échelle internationale (WGO, 2008).

b- innocuité

Un microorganisme probiotique doit présenter une innocuité totale pour le consommateur, et ne présenter aucune propriété indésirable possible : résistance aux antibiotiques, cytotoxicité, activité hémolytique,...etc (Piquepaille, 2013).

La majorité des microorganismes reconnus comme étant probiotiques sont utilisés en agroalimentaire et sont consommés depuis longtemps. Cette consommation témoigne de leur caractère inoffensif et leur attribue un statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Normand et al., 2006).

Synthèse Bibliographique

Avant de pouvoir utiliser une souche probiotique, il est important de vérifier le fait qu'elle ne présente pas de résistance aux antibiotiques portée sur un plasmide, et qu'elle soit donc incapable d'induire une résistance aux antibiotiques chez un autre microorganisme (Denohue, 2004 ; Ammor et Mayo, 2007).

c-origine

Les souches probiotiques d'origine humaine sont plus compatibles avec le tractus intestinal humain, elles peuvent cependant être d'une origine autre qu'humaine (animale, alimentaire, ou végétale), tant qu'elles ne sont pas reconnues comme étant dangereuses (Piquepaille, 2013).

II.4.2.Critères Fonctionnels

Pour être en conformité avec la définition de la **FAO/OMS (2001)**, les souches probiotiques doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs sur la santé de l'hôte, les critères fonctionnels à vérifier sont les suivants :

a-Survie au cours du transit digestif

Les probiotiques sont généralement administrés par voie orale (par ingestion avec des aliments), et doivent arriver vivants à l'intestin, pour cela, ils doivent survivre durant leur transit dans le tube digestif (Piquepaille, 2013).

La survie des probiotiques commence par l'acidité de l'estomac et l'effet de la pepsine sécrétée dans la muqueuse stomacale, leur capacité à tolérer le faible pH du suc gastrique leur permet de résister plus ou moins longtemps aux conditions de l'estomac (Piquepaille, 2013).

Après l'estomac, les probiotiques devront résister à l'action détergente des sels biliaires produits dans le duodénum, sauf s'ils possèdent une BSH (Bile Salt Hydrolase) qui leur permettra alors de déconjuguer les sels biliaires (Piquepaille, 2013).

Les souches probiotiques devront ensuite résister aux autres enzymes digestives libérées dans l'intestin (Piquepaille, 2013).

Synthèse Bibliographique

b-capacité d'adhésion aux cellules intestinales et/ou au mucus

Beaucoup d'effets bénéfiques des probiotiques semblent être liés directement à leur capacité d'adhésion, cette capacité permet aux probiotiques de :

-résister aux mouvements péristaltiques de l'intestin : si les probiotiques peuvent adhérer à la muqueuse intestinale, ils tiendront plus longtemps (**Alegre-Izquierdo, 2009**).

-moduler le système immunitaire : les probiotiques adhérents sont en contact direct avec les cellules immunitaires de l'épithélium intestinal, ils pourront donc moduler ou stimuler le système immunitaire (**Alegre-Izquierdo, 2009**).

c-activité antimicrobienne

Les microorganismes probiotiques doivent essentiellement maintenir de bonnes conditions sanitaires dans le tube digestif, ils doivent donc pouvoir inhiber le développement des germes indésirables (**FAO/WHO, 2001**), et pour cela, plusieurs mécanismes d'action sont envisageables :

-par empêchement de l'adhésion des germes pathogènes aux cellules de la paroi intestinale.

-par compétition pour les nutriments, ce qui provoque une diminution de la quantité de substrats disponibles pour les germes indésirables.

-par production de substances bactéricides ou bactériostatiques, notamment :

- **le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)**

Il est produit par les genres de bactéries lactiques, surtout par les espèces du genre *Lactobacillus* (**Dellaglio et al., 1994**).

Le peroxyde d'hydrogène agit sur les microorganismes qu'il cible en perméabilisant leur membrane, il peut aussi agir comme un précurseur pour la formation de radicaux libres comme l'ion superoxyde (O⁻) qui peuvent endommager l'ADN (**Ammor et al., 2006**)

- **Les acides organiques**

En général, la production d'acides organiques permet d'acidifier le milieu, ce qui peut limiter la croissance de certaines bactéries indésirables ou bien les tuer si ces bactéries sont exposées à l'acidité pendant une longue durée (**Champagne et al., 1992**).

Synthèse Bibliographique

Ainsi, les acides organiques ont différentes actions telles qu'un excellent pouvoir bactéricide ou un effet bactériostatique contre les micro-organismes pathogènes se trouvant dans le tube digestif (**Jedidi, 2007**).

- **Les bactériocines**

Les bactériocines ont été définies par **Tagg et al. (1976)** comme étant « des substances de nature protéique produites par des bactéries et agissant sur d'autres bactéries taxonomiquement proches », elles ont ensuite été définies par **Klaenhammer (1988)** comme étant « des substances de nature totalement ou partiellement protéique, à activité bactéricide en vers les bactéries proches de la souche productrice, elles sont synthétisées par voie ribosomique sous forme de peptides inactifs et deviennent actives en milieu extracellulaire ». Plus récemment, en 2007, Heng et al. Les ont caractérisées comme étant des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traductionnellement, de masses moléculaires comprises entre 2 et 6 kDa (**Heng et al., 2007a**).

Les bactériocines ont été classées par Klaenhammer en 4 classes distinctes :

Classe I : les lanthibiotiques, qui sont de petits peptides, à PM<5 kDa et agissant sur la membrane cytoplasmique. Elles possèdent des acides aminés modifiés (la lanthionine et la β -méthyl-lanthionine), on en cite comme exemples la nisine, la subtiline, la duramycine, et la cytolysine L1 (**Delves-Broughton et al., 1996 ; Saris et al., 1996 ; Sahl et Bierbaum, 1998**).

Classe II : ce sont des peptides de petite taille, à PM<10 kDa, thermostables. Sans acide aminé modifié, mais contiennent des ponts disulfure issus de la liaison entre deux résidus de cystéine, elles agissent en formant des hélices amphiphiles avec des régions hydrophobes. Cette classe est subdivisée en trois sous-classes :

II-a-des bactériocines actives contre *Listeria* spp et ayant une séquence N-terminale comme suit : YG-NGV (boîte *Pediocin Box*). La pédiocine PA-1, la sakacine P, la leucocine A-UAL187 et la curvacine A en sont des exemples (**Hastings et al., 1991 ; Holck et al., 1992 ; Tichaczek et al., 1992 ; Chikindas et al., 1995**).

Synthèse Bibliographique

II-b-ce sont des bactériocines à deux peptides, et qui forment un complexe de poration quand elles sont actives. La lactococcine G et la lactacine F en sont des exemples (Nissen-Meyer *et al.*, 1992 ; Mullet-Powell *et al.*, 1998)

II-c-ce sont des peptides thiol-activés qui nécessitent la présence d'un résidu cystéine pour être actifs. On cite la lactococcine B comme exemple (Venema *et al.*, 1993).

Classe III : cette classe comprend des bactériocines à poids moléculaire supérieur à 30 kDa. Ces bactériocines sont thermosensibles, on en cite l'helvéticine J et les lactocines A et B comme exemples (Joerger et Klaenhammer, 1986 ; Toba *et al.*, 1991a)

Classe IV : cette classe englobe les bactériocines qui ont besoin de la présence d'une partie non protéique (comme un lipide ou un sucre) pour être actives. C'est le cas de la Pédicocine SJ-1 et de la lactocine 27 (Upreti et Hinsdill, 1975).

II.4.3.Critères Technologiques

En plus des critères de sécurité et des critères fonctionnels qui ont déjà été cités, de nombreux aspects technologiques doivent être pris en compte pour la sélection des souches probiotiques, et ces aspects sont les suivants :

a-Viabilité et stabilité des microorganismes au cours de la production

Par cette idée, on désigne la stabilité physique et génétique des microorganismes, avec une variabilité minimale tout au long de la chaîne de production, ainsi qu'une viabilité optimale (Piquepaille, 2013).

b-Conservation des propriétés probiotiques dans le produit fini

Les souches probiotiques doivent rester stables lors de la conservation du produit et doivent être fournies en dosage approprié jusqu'à la date d'expiration du produit (Piquepaille, 2013).

c-Attribution de propriétés organoleptiques

Pour attirer le consommateur, les produits à base de probiotiques doivent posséder de bonnes propriétés organoleptiques, surtout le goût (Piquepaille, 2013).

Synthèse Bibliographique

Les propriétés probiotiques suivantes :

- Activité antibactérienne.
- Résistance aux sels biliaires.
- Résistance à l'acidité.
- Et résistance aux enzymes digestives.

Qui font l'objet de notre étude seront énumérées plus en détails dans la partie suivante qui est la partie Matériel et Méthodes.



***Matériel et
Méthodes***

Matériel et méthodes

Le travail réalisé a pour but d'étudier quelques propriétés probiotiques de souches de BL isolées d'un fromage artisanal, à savoir l'activité antibactérienne et la résistance aux conditions du tube digestif : l'acidité gastrique, les sels biliaires et les enzymes digestives.

I. Matériel

I.1. Matériel et appareillage

Le matériel et l'appareillage utilisés sont énumérés dans le tableau II :

Tableau II : Appareillage et matériel utilisé

Appareillage	Matériel
Autoclave	Boîtes de Pétri
Plaque chauffante	Tubes à essai
Bain Marie	Eppendorfs
Réfrigérateur	Tubes Falcon
Balance Electronique	Erlenmes Meyer
Etuve	Eprouvettes graduées
Vortex	Béchers
Centrifugeuse	Ecouvillons
Micropipettes	
pH mètre	
Four Pasteur	

I.2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont les suivants :

- Bouillon MRS
- Gélose MRS
- Bouillon Nutritif
- Gélose Nutritive

Matériel et méthodes

I.3. Origine des souches

Les souches de BL étudiées dans ce travail ont été isolées à partir d'un fromage artisanal Alatig et identifiées phénotypiquement au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia en 2017 puis conservées à -18°C dans du bouillon MRS additionné de 20% de glycérol.

II. Méthodes

II.1. Revivification des souches

Les souches conservées ont été décongelées puis revivifiées par une série de deux repiquages successifs dans 10 ml de bouillon MRS avec une incubation de 24h à 37°C pour chaque repiquage (**Figure 2**).

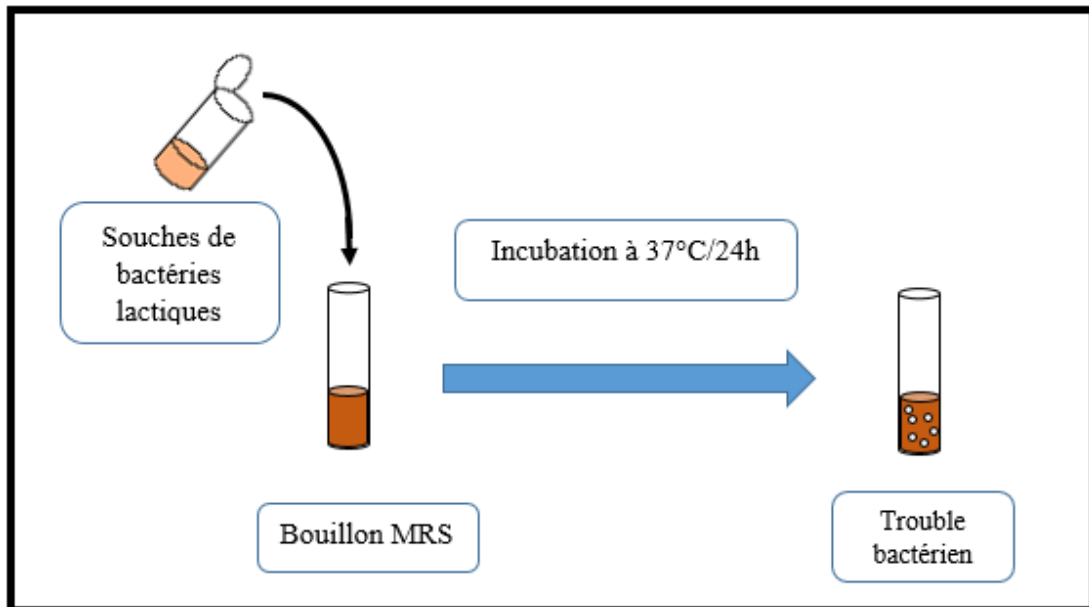


Figure 2 : Repiquage des souches de bactéries lactiques

Matériel et méthodes

II.2. Tests d'activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques

L'activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques a été mise en évidence par la réalisation de deux tests, ces tests sont les suivants :

II.2.1. Test des spots

Dans ce test, l'antagonisme des souches de bactéries lactiques a été étudié à l'égard de deux germes cibles pathogènes : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

5 µl du repiquat de chaque souche de bactérie lactique ont été ensemencés en spots dans des boîtes de Pétri contenant 10 ml de gélose MRS, puis incubées à 37°C pendant 24 heures (Fernandez et al., 2007).

La suspension de chaque pathogène a été diluée deux fois et la dilution 10^{-2} a été mélangée à 100 ml de gélose nutritive en surfusion. Après homogénéisation, la gélose a été versée dans les boîtes de gélose MRS à raison de 10 ml par boîte. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24 heures (Figure 3).

A la fin de la période d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et les souches qui ont donné des diamètres supérieurs à 10 mm ont été retenues.

Matériel et méthodes

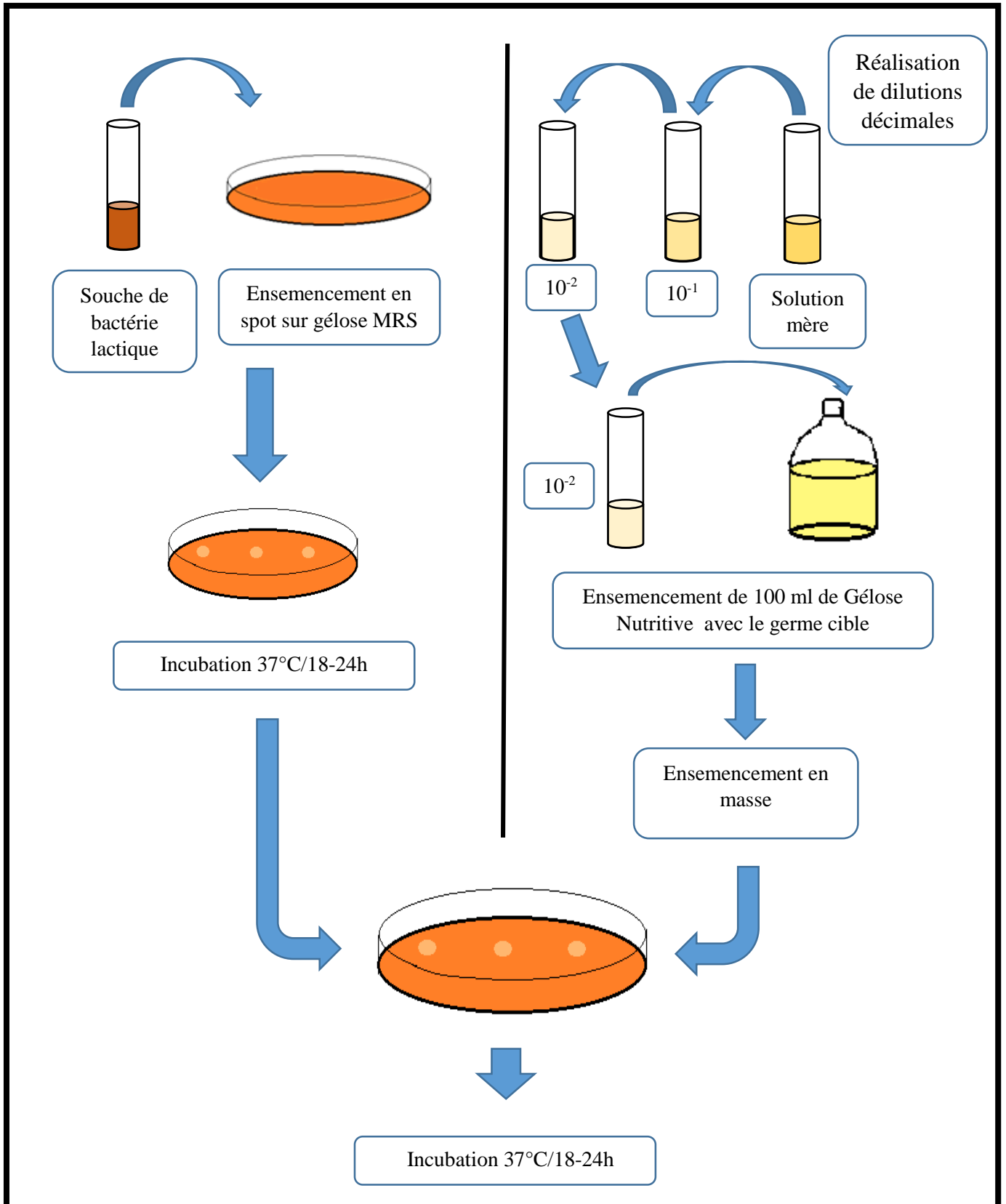


Figure 3 : Test des spots des souches de bactéries lactiques contre *S. aureus* et *E. coli*

II.2.2. Test des puits

Dans ce test, le but était d'étudier l'activité du surnageant de culture des souches de bactéries lactiques à l'égard de *S. aureus* et *E. coli*.

Les souches de bactéries lactiques ont été repiquées dans du bouillon MRS, après incubation à 37°C/24h, les cultures ont été soumises à une centrifugation à 6000 rpm/30 min à 4°C. Le surnageant de culture a ensuite été récupéré.

Des boîtes de Pétri ont ensuite été coulées avec de la gélose nutritive, après solidification, la dilution 10^{-2} du germe cible a été ensemencée par écouvillonnage puis laissée à sécher.

Après séchage, des puits de 8 mm de diamètre ont été creusés puis remplis avec 100µl de chaque surnageant. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C/24h (**Figure 4**).

A la fin de la période d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et les souches dont le surnageant a donné un diamètre situé entre 8 et 10mm (y compris le diamètre du puits) ont été retenues.

Matériel et méthodes

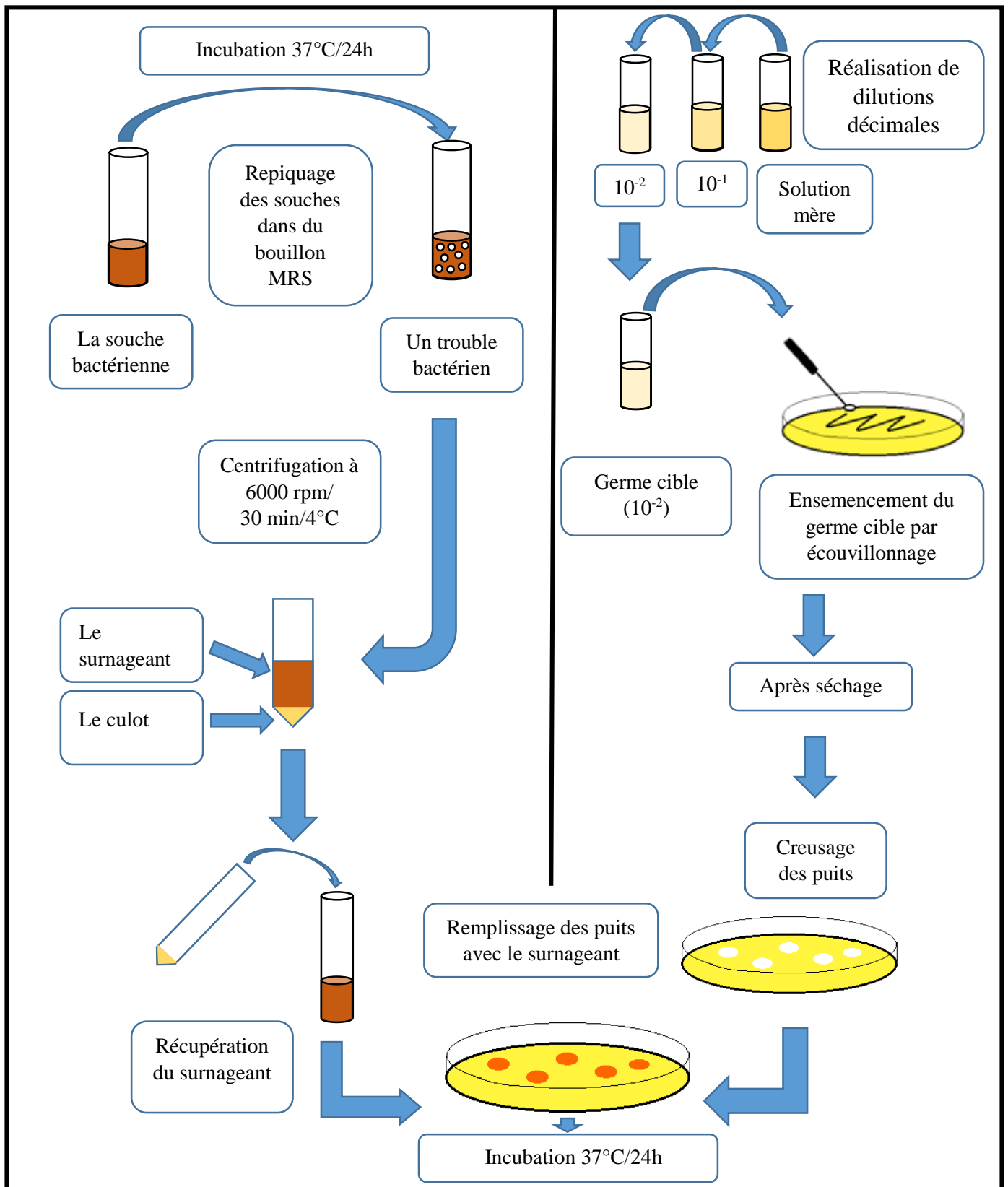


Figure 4 : Test des puits des souches de bactéries lactiques contre *S. aureus* et *E. coli*

Matériel et méthodes

II.3. Effet du pH sur les souches de bactéries lactiques

Dans le but de savoir si les souches de BL résistent à différents pH, le test d'effet du pH est réalisé comme dans la **figure 5** :

300 ml de bouillon MRS a été préparé et réparti dans des flacons de 100 ml.

Chaque volume de 100 ml de a ensuite été ajusté à trois pH différents : pH 3, pH 4, et pH 5.

Le bouillon a été versé dans des tubes à essai à raison de 5 ml par tube. Ensuite, un volume de 50 µl de la suspension de chaque souche a été inoculé dans chacun des tubes.

Les tubes ont été incubés à 37°C/24h, et après incubation, le trouble de chaque souche de bactérie lactique a été observé et les souches à croissance bonne ont été retenues.

Matériel et méthodes

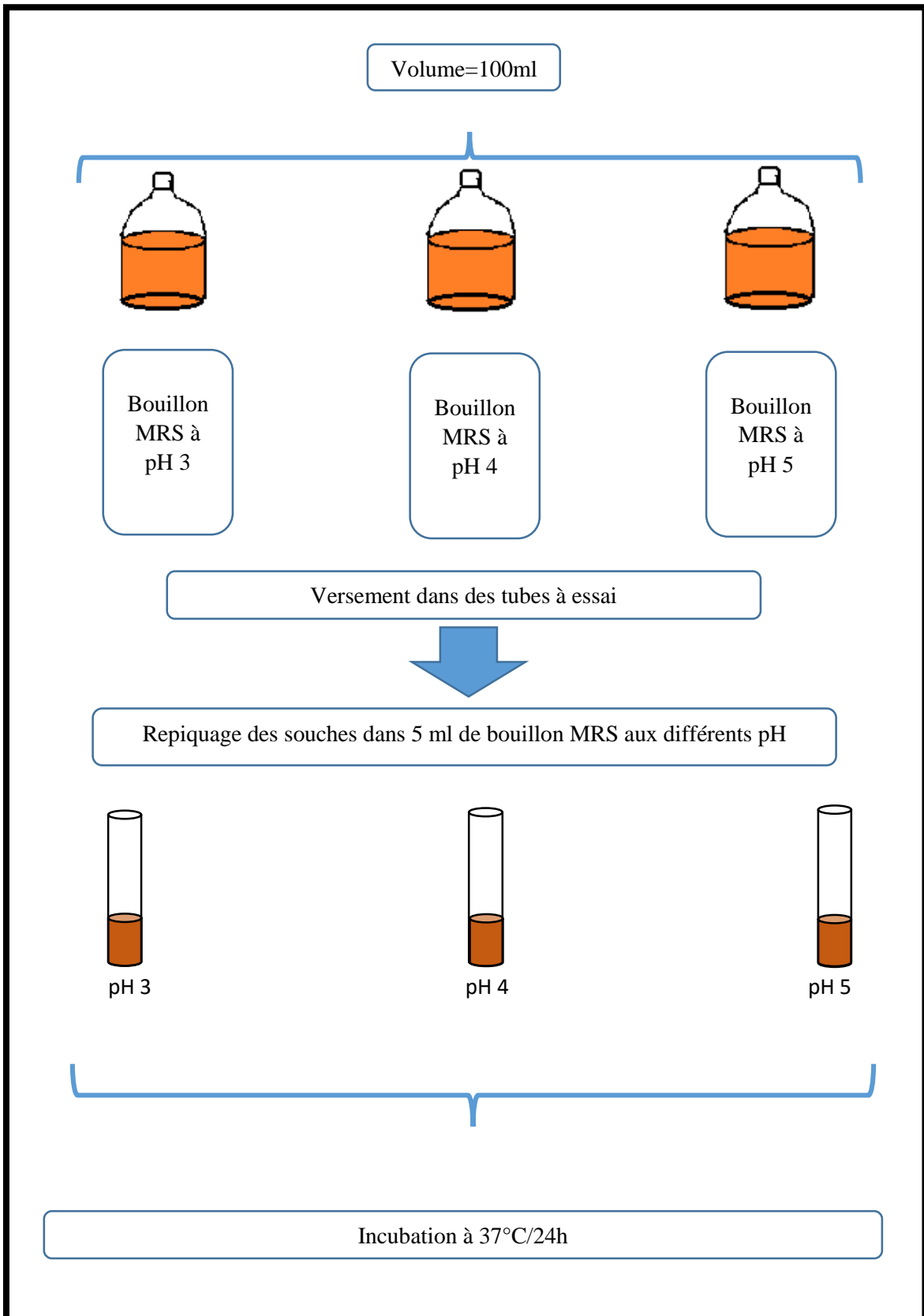


Figure 5 : Etude de l'effet du pH sur les souches de bactéries lactiques

II.4. Effet des sels biliaires sur les souches de bactéries lactiques

Pour savoir si les souches de BL résistent à différentes concentrations de sels biliaires, le test suivant est réalisé :

Des poids de 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; et 3 g de sels biliaires ont été pesés.

Chaque poids de sels biliaires a été ajouté à 100 ml de gélose MRS en surfusion pour préparer six concentrations différentes : 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, et 3%.

Les géloses préparées ont été coulés dans des boîtes de Pétri.

Un volume de 5 μ l de chacune des souches de bactéries lactiques retenues après le test des puits a étéensemencé en spots dans les boîtes puis laissé sécher.

Une fois les boîtes sèches, une incubation de 24h à 37°C a été lancée (**Figure 6**).

Après incubation, la croissance a été observée et les souches de bactéries lactiques qui se sont développées ont été retenues.

Matériel et méthodes

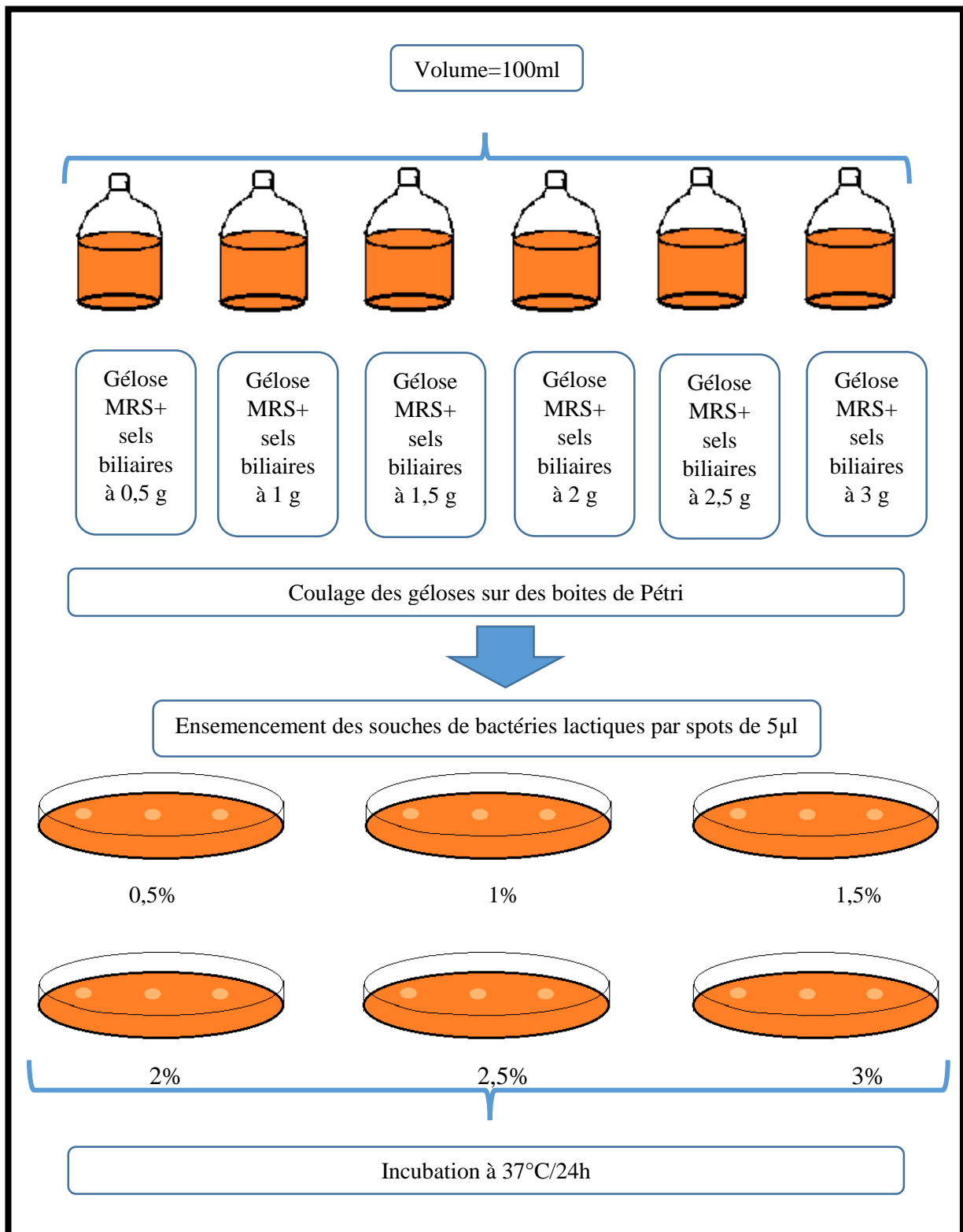


Figure 6 : Etude de l'effet des sels biliaires sur les souches de bactéries

II.5. Effet des enzymes digestives sur les souches de bactéries lactiques

Les souches de bactéries lactiques ayant montré une résistance à la bile ont été testées pour étudier l'effet de deux enzymes digestives : la pepsine et la trypsine.

Préparation des solutions enzymatiques

60mg de chaque enzyme sous forme lyophilisée ont été pesés et mis en suspension dans 2 ml de tampon correspondant au pH optimal de chaque enzyme (tampon phosphate de sodium à pH 7 pour la trypsine, et tampon Glycine/HCl à pH 3 pour la pepsine), chaque mélange (tampon + enzyme) a été filtré à l'aide d'un filtre à seringue (diamètre des pores = 0,22µm) puis mélangé à 18 ml de gélose MRS additionnée de sels biliaries, après homogénéisation, la gélose a été coulée dans des boites de Pétri puis laissée à solidifier. Les souches de bactéries lactiques ont été déposées en spots de 5µl sur les boites puis laissées à sécher. Les boites ont ensuite été incubées à 37°C/24h (**Figure 7**).

A la fin de la période d'incubation, la croissance a été observée et les souches de bactéries lactiques qui se sont développées ont été retenues.

Matériel et méthodes

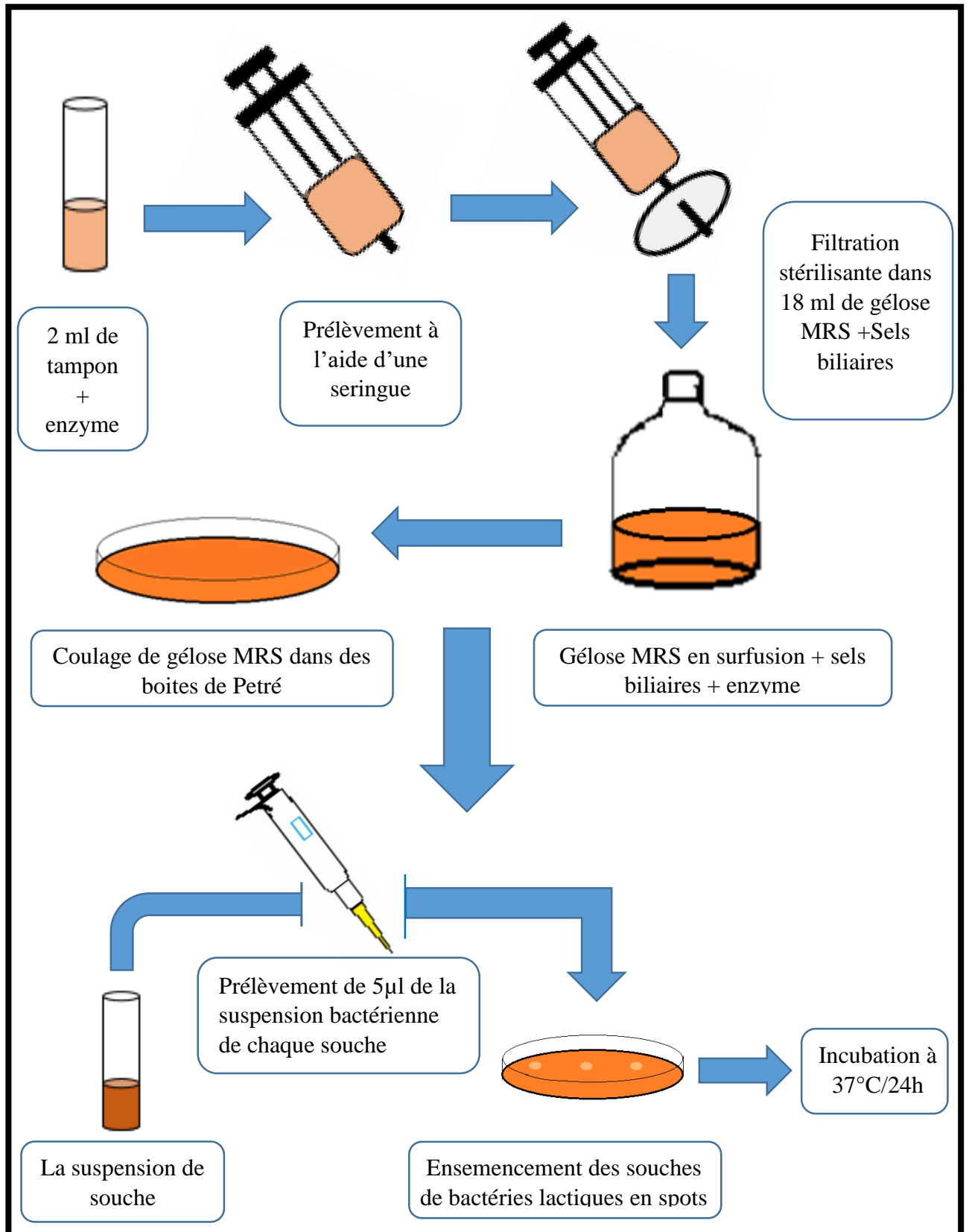


Figure 7 : Etude de l'effet des enzymes digestives sur les souches de bactéries



***Résultats et
Discussion***

Résultats et discussion

I. Tests d'activité antibactérienne

I.1. Test des spots :

Les résultats du test des spots ont montré que toutes les souches de BL testées possèdent une activité inhibitrice contre *S. aureus* et *E. coli* avec des diamètres d'inhibition variant de 12 à 33 mm contre *S. aureus* et de 22 à 36 mm contre *E. coli* (**Figures 9 et 11**).

Une sélection des meilleures souches a été réalisée et les souches qui n'ont pas d'activité ont été rejetées.

Parmi les 31 souches de bactéries lactiques testées, les souches S35, S21, S9 et S45 n'ont pas d'activité contre *E. coli* et les souches S35, S21, S9, S45, S14 et S50 n'ont pas d'activité contre *S. aureus*, alors que les souches 11 et 12 sont les plus actives contre *E. coli* avec des zones d'inhibition de 35 et 36 mm de diamètre respectivement, et les souches S22 et S40 sont les plus actives contre *S. aureus* avec des zones d'inhibition de 32 et 33 mm de diamètre respectivement (**Figures 9 et 11**).

Les figures 8 et 10 illustrent des exemples de résultats positifs qui ont été obtenus contre *E. coli* et contre *S. aureus*. On peut aussi noter l'apparition de zones d'inhibitions larges et claires autour des colonies de certaines souches, synonymes d'une bonne activité antibactérienne. Cette activité, étant forte, peut très probablement être attribuée à une production de bactériocines et/ou d'acides organiques.

Résultats et discussion

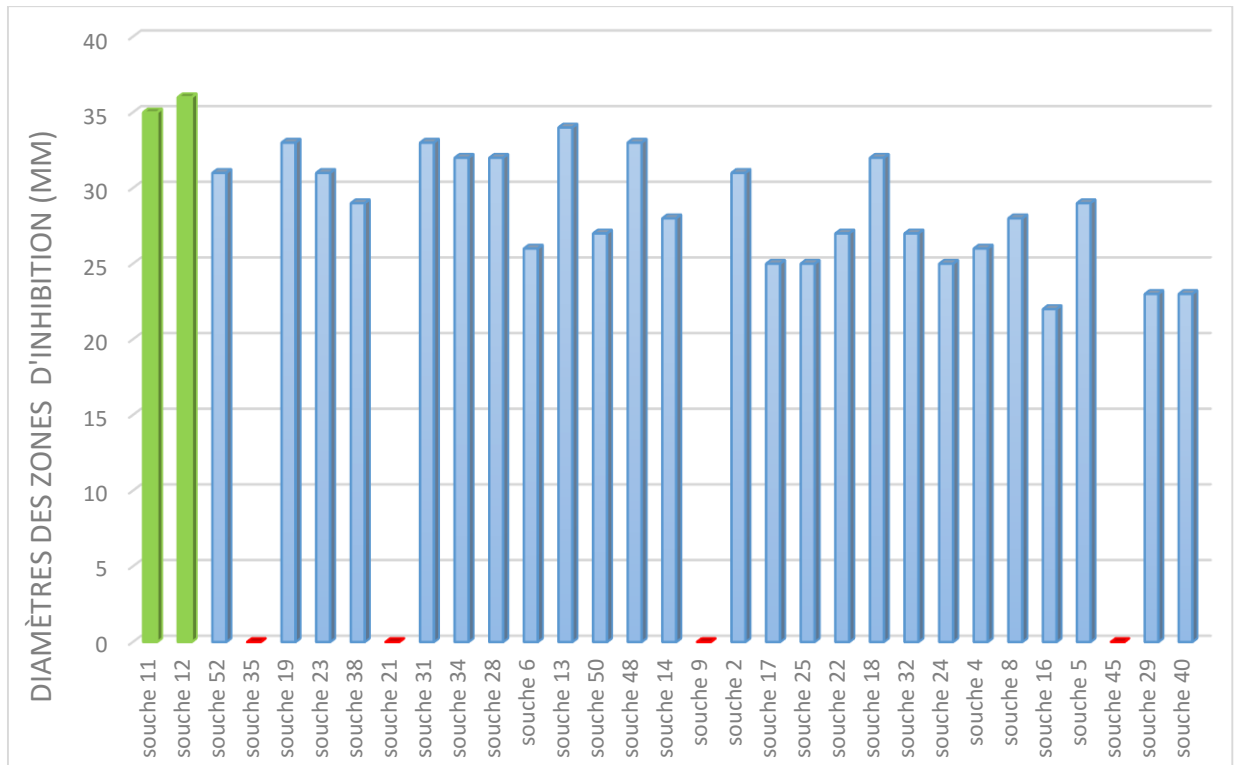


Figure 9 : Activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques à l'égard d'*E. coli*

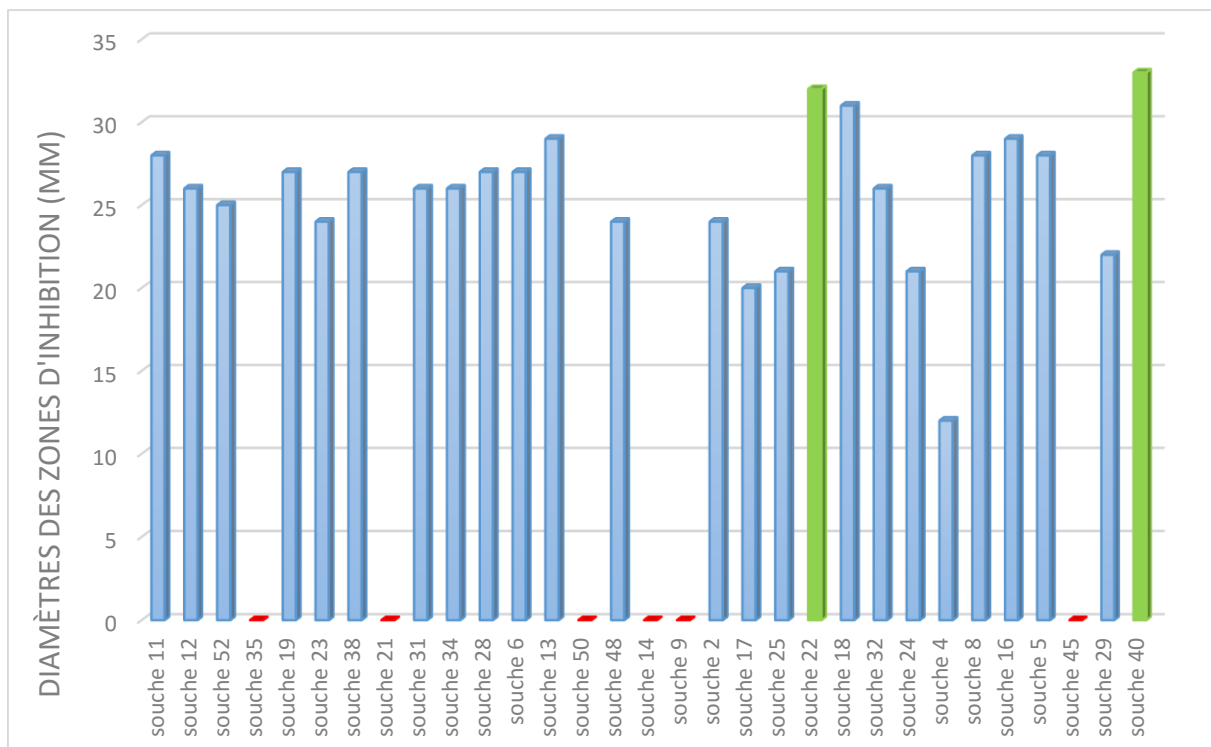


Figure 11 : Activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques à l'égard de *S. aureus*

Résultats et discussion

I.2. Test des Puits :

Les résultats du test des puits ont montré que la majorité des surnageants de culture des souches de bactéries lactiques testées possèdent une activité inhibitrice contre *S. aureus* et *E. coli* avec des diamètres de zones d'inhibition qui varient de 10 à 19 mm contre *S. aureus* et de 13 à 17 mm contre *E. coli* (**Figures 13 et 15**).

Les meilleures souches ont été sélectionnées, et les souches dont le surnageant n'a pas eu d'activité ont été rejetées.

Parmi les surnageants des souches de bactéries lactiques testées, ceux des souches 17 et 40 n'ont pas d'activité contre *E. coli* et ceux des souches 6, 23 et 40 n'ont pas d'activité contre *S. aureus*, alors que les souches 13 et 12 sont celles dont le surnageant a une meilleure activité contre *E. coli* avec des diamètres d'inhibition de 16 et 17mm respectivement, et les souches 32 et 2 sont celles dont le surnageant a une meilleure activité contre *S. aureus* avec des diamètres d'inhibition de 18,5 et 19 mm respectivement (**Figures 13 et 15**).

Les figures 12 et 14 illustrent des exemples de résultats positifs qui ont été obtenus contre *E. coli* et contre *S. aureus*, on peut noter l'apparition de zones d'inhibition autour des puits, de quoi confirmer que cette activité pourrait très probablement être due à une production d'acides organiques et/ou de bactériocines.

Résultats et discussion

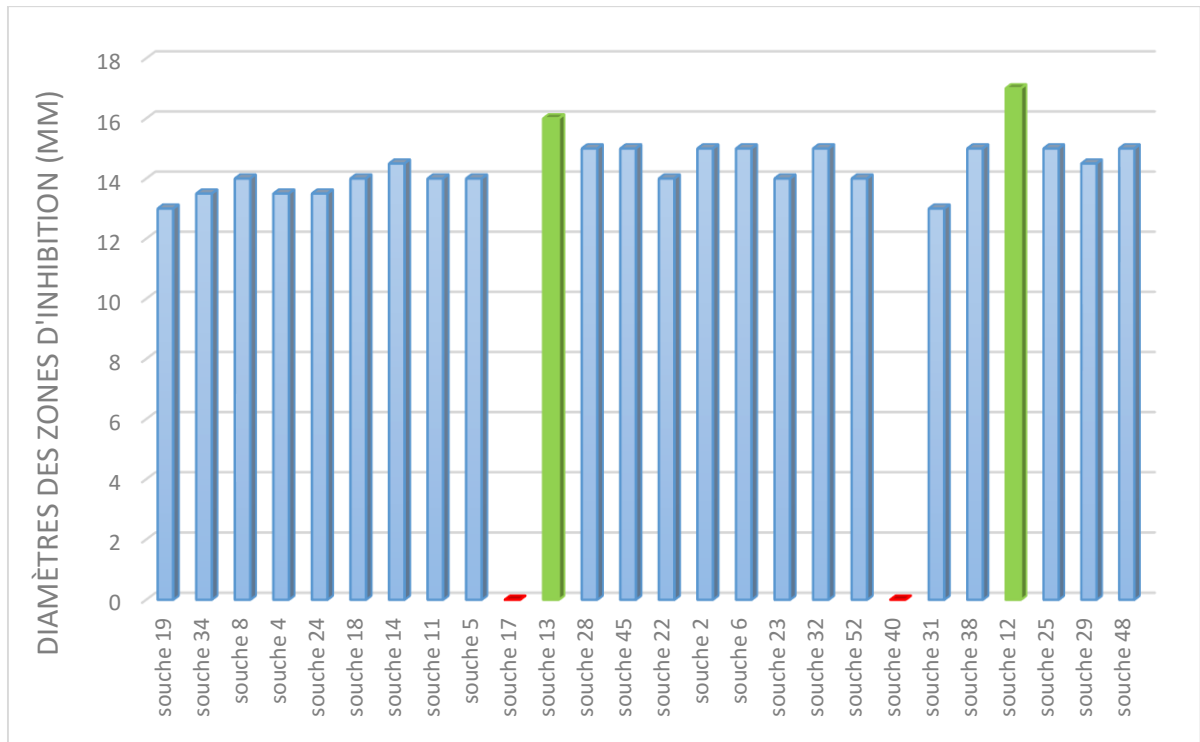


Figure 13 : Activité antibactérienne des surnageants des souches de bactéries lactiques à l'égard d'*E. coli*

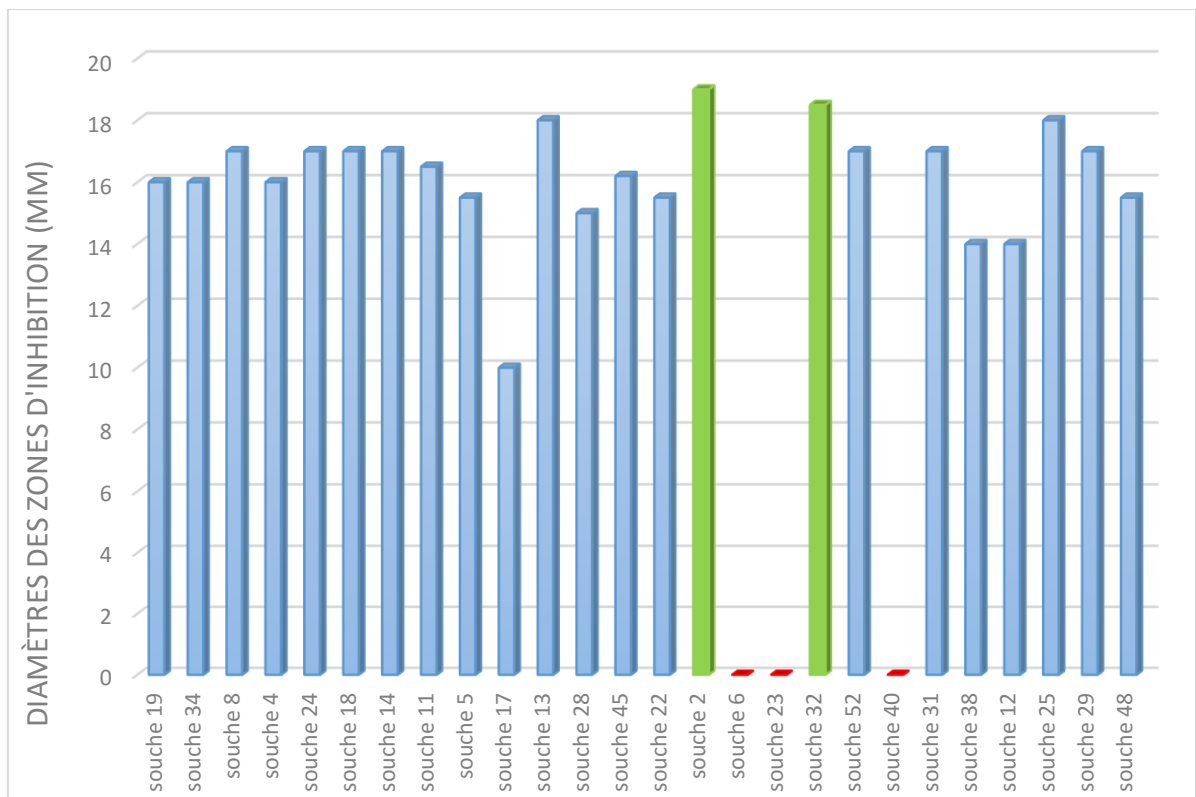


Figure 15 : Activité antibactérienne des surnageants des souches de bactéries lactiques à l'égard de *S. aureus*.

Résultats et discussion

Dans une étude réalisée par **Djadouni (2013)** et ayant eu pour objectif l'établissement d'une banque de souches de BL sélectionnées comme productrices de bactériocines, et l'identification, la purification et l'application des bactériocines produites, 141 souches de BL ont été testées pour leur activité antimicrobienne selon deux méthodes :

-méthode de diffusion en puits (selon la méthode de **Tagg et McGiven, 1971**, qui consiste à mettre en contact le surnageant de la souche de BL avec le germe cible).

-la méthode de spots (selon la méthode de **Fleming et al., 1975**, qui consiste à cultiver les deux souches dans le même milieu en double couche).

Les Résultats obtenus étaient les suivants :

-Parmi les souches testées, les souches de *Lactobacillus* ont un spectre d'activité élevé, elles ont d'ailleurs inhibé un nombre de souches inférieur ou égal à 5.

-Une souche de *Lb. plantarum* a eu une activité inhibitrice contre 9 des germes pathogènes testés, notamment *E. coli* et *S. aureus* β -hémolytique.

Une autre étude réalisée par **Mami (2013)** et ayant pour but de rechercher des souches de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* capables de produire des substances antimicrobiennes à partir du lait cru de chèvre en utilisant les mêmes tests a donné les résultats suivants :

-l'interaction entre les souches de *Lactobacillus* et les souches tests indiquent que l'agent inhibiteur est une bactériocine, cependant, comme dit par **Mami et al. (2012)**, l'activité peut aussi être attribuée à une production d'acides organiques.

-l'activité antimicrobienne est apparue chez 8 isolats (sur les 252 de départ) appartenant aux espèces *Lactobacillus plantarum* (2), *Lb. rhamnosus* (2), *Lb. acidophilus* (1), *Lb. sakei* subsp. *sakei* (1), *Lb. casei* (1), et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (1).

-sur milieu tamponné, une souche (S58) a eu une activité inhibitrice considérable avec 22 mm de diamètre contre *S. aureus* et 12 mm avec *E. coli*. Cette activité a été attribuée à la production d'une bactériocine (car l'effet des acides organiques a été neutralisé dans le milieu tamponné) Une autre souche de la même espèce (S68) a donné une inhibition avec 14 mm de diamètre contre *S. aureus*, 11 mm avec *B. cereus*, et 10 mm avec *E. coli*.

Résultats et discussion

-les deux souches de *Lb. plantarum* ont été testées pour leur activité inhibitrice contre trois souches de *S. aureus* (ATCC 25923, ATCC 29213, et ATCC 43300) et une souche d'*E. coli* (ATCC 25922) les résultats obtenus étaient significatifs, surtout pour la souche 58.

L'étude de **Beneddine et Djebrit (2015)** qui avait pour but d'isoler des souches de *Lactobacillus* à partir d'un lait de chamelle, en étudier l'activité antimicrobienne contre quelques germes pathogènes isolés d'un laboratoire d'analyses médicales de Ouargla, et identifier les substances inhibitrices produites a été réalisée par un test des puits en suivant la méthode de **Barefoot et al. (1983)**. Quatre souches de bactéries lactiques ont été testées à l'égard de quatre germes pathogènes dont *S. aureus* et *E. coli*. Les résultats de recherche de l'agent inhibiteur dans le surnageant ont révélé que l'agent était extracellulaire. Les diamètres d'inhibition ont ensuite été mesurés, trois souches de *Lactobacillus* ont alors été retenues à cause de leur activité inhibitrice contre *S. aureus* et *E. coli* avec des diamètres dépassant les 10 mm.

Les résultats obtenus lors d'études supplémentaires réalisées avec surnageant tamponné ont prouvé que l'agent inhibiteur était des acides organiques et des bactériocines contre tous les germes ciblés.

En comparaison avec les autres travaux, les résultats obtenus dans les tests d'activités sont conformes avec les définitions données, avec une similarité avec ceux de **Djadouni (2013)**, l'évaluation visuelle de l'inhibition des souches contre *S. aureus* était identique à celle de **Mami (2013)**. Il en est de même en comparaison avec ce qui a été obtenu par **Beneddine et Djebrit (2015)**.

II. Effet du pH :

Les résultats du test de résistance à l'acidité montrent que la résistance varie selon les souches.

Après analyse des résultats obtenus, les observations suivantes ont été notées :

-à pH 3, 15/21 souches ont donné une croissance bonne.

-à pH 4, 12/21 souches ont donné une croissance bonne.

-à pH 5, appart la souche 13, toutes les souches ont donné une croissance moyenne.

Résultats et discussion

La majorité des souches qui ont montré une bonne croissance aux pH 3 et 4.

Les souches 19 et 31 et 8 qui ont montré une bonne croissance à pH 3 n'ont pas gardé leur caractéristique à pH 4, l'augmentation du pH les ayant probablement inhibées, ce résultat pourrait être expliqué par l'incapacité à s'adapter et donc survivre à l'acidité.

Comme le montre la **figure 16**, un trouble bactérien a été remarqué aux pH 3 et 4, synonyme de croissance bactérienne, mais c'était plus intense à pH 4 qu'à pH 3, ce qui confirme le caractère acidotolérant des BL.

Mishra et Prasad (2005) ont réalisé une étude ayant pour but de sélectionner des souches de *Lb. casei* comme étant probiotiques en utilisant des méthodes *in vitro* et de les incorporer dans le Dahi, un lait fermenté produit en Inde. Pour cela, ils ont réalisé des tests dont le test de tolérance à l'acidité.

7 souches ont été testées pour leur résistance aux pH 1, 2, et 3, et elles ont toutes montré une bonne capacité de survie à pH 3 pendant 3h, alors qu'à pH 1, aucune n'a survécu et à pH 2, quelques isolats ont pu survivre. L'une des souches résistantes au pH 3 a été comptée sur boîte et a donné un taux dépassant les 10^7 UFC/ml après 3h d'incubation.

Berrada et al. (1991) a réalisé une étude sur deux souches de *Bifidobacterium* dans le but d'en étudier la capacité de résister au transit gastrique *in vitro* puis *in vivo*, et d'évaluer leur survie dans le tractus gastro-intestinal en les administrant avec un lait fermenté.

Lors du test de survie au pH 3, l'une des deux souches testées a montré une résistance bien meilleure que celle de l'autre souche après au moins 90 min. En incorporant chacune des souches dans un lait fermenté, la survie à l'acidité a été évaluée et une différence de densité microbienne de 6.10^7 chez l'une des deux souches pour 6.10^5 chez l'autre a été remarquée.

Après comparaison des résultats du test de résistance au pH 3 à ceux obtenus par **Mishra et Prasad (2005)** et par **Berrada et al. (1991)**, on conclue qu'il y a conformité, cependant, il reste à confirmer l'origine de l'adaptation des souches au pH acide. **Guillouard et al. (2004)** ont étudié les mécanismes responsables de la résistance au stress acide chez des souches de *Lactobacillus bulgaricus* en montrant la variabilité de la capacité de résistance aux pH bas chez ces souches, ils ont ensuite caractérisé les protéines induites lors de

Résultats et discussion

l'adaptation à l'acidité par électrophorèse bidimensionnelle et par des techniques génétiques pour mieux comprendre l'adaptation aux différents stress rencontrés par la bactérie.

Cinq souches de *Lactobacillus bulgaricus* ont été soumises à une étude comparative de leur capacité à tolérer le stress acide. Les souches ont été transférées d'un milieu à pH 6 au pH 3,6 pendant 30 minutes. Après mesure du taux de survie, **Guillouard et al.** ont remarqué qu'une des souches tolérait le stress acide mieux que les autres. De quoi confirmer que la tolérance à l'acidité est une caractéristique de souche.

Après analyse du génome de la souche résistante, les résultats étaient prometteurs. De ce point de vue, ils sont en accord avec ceux de **Berrada et al. (1991)**.

III. Effet des sels biliaires :

Les résultats de l'étude de l'effet des sels biliaires montrent que les souches résistent aux sels biliaires, cependant, chez des souches de la même espèce, des résultats différents ont été observés, comme c'était le cas chez la souche S31 (qui s'est développée aux trois premières concentrations) et la souche S19 (qui s'est développée à toutes les concentrations). La capacité de résistance aux sels biliaires a été confirmée alors comme étant une caractéristique de souche.

Après l'analyse des résultats, les observations suivantes ont été notées :

-à 0,5% de sels biliaires, 6/15 souches ont donné une croissance.

-à 1% et 1,5% de sels biliaires, 4/15 souches ont donné une croissance.

-à 2%, 2,5%, et 3% de sels biliaires, seule la souche 19 a donné une croissance.

La résistance aux sels biliaires peut être attribuée à la présence de la BSH ou à la capacité de dégradation des sels biliaires chez les souches de BL, la capacité de dégradation des sels biliaires a été observée aux concentrations 2%, 2,5% et 3% de sels biliaires pour la souche 19 comme un halo clair autour de la colonie.

Résultats et discussion

Comme décrit précédemment, **Mishra et Prasad (2005)** ont étudié la capacité de souches de *Lactobacillus casei* à survivre aux conditions du tractus gastro-intestinal, dont la tolérance aux sels biliaries.

Les 7 souches ont été soumises à des concentrations de 1% et de 2% de sels biliaries puis incubées à 37°C en aérobiose, et dénombrées sur gélose à 3 h et 12 h d'incubation.

Les résultats rapportés témoignent d'une bonne résistance chez deux des souches testées après 12 h d'incubation, et de deux autres souches après 3 h d'incubation.

Desai (2008) a étudié les critères probiotiques de 22 souches de *Lactobacillus casei*, dont leur capacité à résister à l'acidité et aux sels biliaries. Il a ensuite utilisé des concentrations de 1% et 1,5% de sels biliaries.

Toutes les souches ont montré une croissance excellente à la concentration 1% de sels biliaries. 7 d'entre elles ont montré une bonne croissance à 1,5% après 3 h alors que les autres ont résisté à cette concentration entre 1 h et 2 h.

Les 7 meilleures souches ont été supplémentées de taurocholate de sodium, de glycocholate de sodium, et d'une combinaison des deux pour en tester la capacité à déconjuguer les sels biliaries, les résultats obtenus ont montré une capacité de déconjugaison élevée chez deux des souches, alors qu'une seule souche a montré une capacité faible.

Les résultats obtenus dans cette étude répondent bien mieux à ceux obtenus par **Mishra et Prasad (2005)** qu'à ceux de **Desai (2008)**, et témoignent d'une résistance intéressante aux sels biliaries chez les souches de BL testées.

IV. Effet des enzymes digestives :

Les résultats de l'étude de l'effet des enzymes digestives sur les souches de bactéries lactiques ont montré que la souche 19 est la seule qui a une bonne capacité de survie en présence de pepsine à pH 3 et de trypsine à pH 7.

Comme le montre la **figure 18**, la souche 19 s'est développée en présence de chacune des deux enzymes testées et à toutes les concentrations de sels biliaries, à sa croissance, un halo clair s'est formé autour de la colonie, synonyme de la dégradation des sels biliaries.

Résultats et discussion

La souche 19 pousse très bien en présence de la pepsine à pH 3, elle peut donc survivre à son passage par l'estomac, et elle pousse très bien en présence de la trypsine à pH 7, elle peut donc survivre dans les conditions de l'intestin. Ces deux résultats obtenus constituent un critère majeur de choix pour les probiotiques.

Dans le travail de **Rönkä et al. (2003)**, le but était d'étudier quelques caractéristiques probiotiques de deux souches de *Lactobacillus brevis* (ATCC 8287 et ATCC 14869) pour les appliquer dans des laits crus, et un test de résistance aux enzymes du fluide pancréatique a été réalisé.

Les résultats rapportés ont montré que les deux souches résistaient, avec des taux dépassant les $4,5 \cdot 10^8$ UFC/ml pour la souche ATCC 8287 après 3 h d'incubation. La souche ATCC 14869 a donné des taux dépassant $8,8 \cdot 10^7$ UFC/ml qui ont ensuite baissé après 3 h d'incubation.

Daniel et al. (2006) ont étudié des souches de BL en évaluant quelques propriétés supposées utiles pour permettre leur survie au tractus gastro-intestinal *in vitro*, les résultats ont été comparés à des données obtenues lors de l'étude de leur survie *in vivo* chez des souris pour savoir si ces souches pouvaient être utilisées dans le traitement des éventuelles colites.

Parmi les propriétés étudiées, la résistance à la pepsine et à la pancréatine dans du tampon PBS (*Phosphate Buffered Saline*) à pH 2 et 8 respectivement. La survie a été évaluée par dénombrement sur gélose puis le taux de survie a été exprimé.

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches testées résistaient à la pepsine pendant 20 minutes sauf deux souches de *Lb. acidophilus* et de *Lb. plantarum* qui ont donné un taux de survie supérieur à la normale. La pancréatine n'a pas non plus eu d'effet sur les souches jusqu'après 2 h d'incubation, sauf sur une souche de *Lb. plantarum* qui était sensible.

Dans le test réalisé, et sur les six souches testées pour leur résistance à la trypsine et à la pepsine, il n'y a qu'une seule souche qui a poussé, et qui a pu résister à l'effet de la pepsine après 24 h d'incubation.

La souche 19 a donné des résultats bien meilleurs que ceux obtenus par **Daniel et al. (2006)**, témoignant d'une bonne capacité à résister aux conditions du tractus gastro-intestinal. Comme cette souche a répondu positivement à tous les tests qui ont été réalisés, elle a été gardée comme potentiel probiotique.



Conclusion

CONCLUSION

L'objectif de notre travail était d'étudier des propriétés probiotiques de quelques souches de bactéries lactiques isolées à partir d'un fromage artisanal « **Alatig** ». Ainsi, pendant notre pratique, 31 souches de bactéries lactiques ont été étudiées.

Les souches de bactéries lactiques ont subi ensuite cinq tests : test des spots, test des puits, test de résistance aux sels biliaires, test de résistance au pH, et test de résistance aux enzymes digestives pepsine et trypsine. Les résultats obtenus témoignent des affirmations suivantes :

- Les propriétés étudiées sont une caractéristique de souche.
- Les souches 2, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 38, 40 sont les plus inhibitrices contre les germes pathogènes ciblés.
- Les souches 2, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 38, 40 résistent mieux à l'acidité que les souches 16, 17, 19, 31, 32, 34, 35, 48.
- L'espèce de la souche 19 a montré un bon potentiel probiotique, avec l'une de ses deux souches représentatives.

Le travail qui a été réalisé n'est que préliminaire, mais il est intéressant, ainsi, les travaux suivants peuvent lui être complémentaires :

-Confirmation de l'identité de la souche 19 par des méthodes moléculaires.

-Etude des critères de sécurité de la souche 19, à savoir :

- La résistance aux antibiotiques.
- Le test de cytotoxicité.
- Et le test d'hémolyse.

-Etude des effets probiotiques *in vivo* de la souche 19.

-Mise au point d'un lait fermenté probiotique à base des souches étudiées.



***Références
Bibliographiques***

Références Bibliographiques

A

Alegre-Izquierdo E., 2009. *Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique.* Strasbourg : Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, 230 p.

Ammor M.S. et Mayo B., 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* **76** : 138-146.

Anukam K. C. et Reid G., 2007. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* A. Méndez-Vilas (Ed.)

B

Balcázar J. L. et Luna T. R., 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against Vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology*, **55** : 409–412.

Barefoot S.F. et Klaenhammer T. K., 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45** : 1808-1815.

Beneddine H. et Djebrit C., 2015. Etude de l'activité antimicrobienne de souches de lactobacilles isolées à partir du lait de chamelle vis-à-vis de quelques souches de pathogènes ciblées. Mémoire de Master Académique, filière de biologie, université de Ouargla.

Benyacoub J., Czarnecki-Maulden G. L., Cavadini C., Sauthier T., Anderson R. E., Schiffrin E. J. et Von der Weid T., 2003. Supplementation of Food with *Enterococcus faecium* (SF68) Stimulates Immune Functions in Young Dogs. *American Society for Nutritional Sciences*. p1158-1162.

Bergogne-Berezin E., 2007. Flores vaginales normales, vaginites et vaginoses bactériennes : diagnostic et thérapeutique. *Antibiotiques* **9**:139-44.

Berrada N, Lemeland J.F., Laroche G., Thouvenot P., Piaia M., 1991. *Bifidobacterium* from fermented milks : survival during gastric transit. *J Dairy Sci.* **74(2)** : 409-413.

Bousvaros A, Guandalini F, Baldassano R, et al., 2005. A Randomized, double-blind trial of *Lactobacillus* GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **11**:833-839.

Brenner D. M. et Chey W.D., 2009. *Bifidobacterium infantis* 35624: A Novel Probiotic for the Treatment of Irritable Bowel Syndrome, *Reviews in gastrointestinal disorders* **9**.

Bhunja A.K., Johnson M. C. et Ray B., 1988. Purification, characterization, and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Microbiology* **65(4)** : 261-268.



Carré D., Simon F., Hance P., Coton T., Delpy R. et Guisset M., 2005. « Diarrhée du voyageur ». *EMC - Hépatogastroentérologie*. **2(3)** : p. 249-263.

Cebrián R., Baños A., Valdivia E., Pérez-Pulido R., Martínez-Bueno M. et Maqueda M., 2012. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology* **30** : 59-67.

Commane D., Hughes R., Shortt C. et Rowland I., 2005. The potential mechanisms involved in the anticarcinogenic action of probiotics. *Mutat Res.* **591(1–2)** : 276–89.

Champagne et al., 1992. In Boudjani, W., 2009. Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.

Chiang B.L., Sheih Y.H., Wang L.H., Liao C.K. et Gill H.S., 2000. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses, *European Journal of Clinical Nutrition* **54** : 849-855.

Chikindas M.L., Venema K., Ledebouer A.M., Venema G. et Kok J., 1995. Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Lett. Appl. Microbiol.*, **21(3)** : 183-189.



Daniel C., Poiret S., Goudercourt D., Dennin V., Leyer G., et Pot B., 2006. Selecting Lactic Acid Bacteria for Their Safety and Functionality by Use of a Mouse Colitis Model, *Applied and Environmental Microbiology*, **72 (9)** : 5799–5805.

Dellaglio F., de Roissart H., Tourriani S., Curk M. C. et Jenssen D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In De de Roissert,H., et Luquet,F.M. «bactéries lactiques». **1** : pp 25-116.

Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R. J. et Hugenholtz J., 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **69(2)** : 193-202.

Denohue D.C., 2004. Safety of novel probiotic bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed.*, Marcel Dekker, Inc. New York. 531-546.

Desai A., 2008. Strain identification, viability and probiotic properties of *Lactobacillus casei*, a thesis submitted for the degree of doctor of philosophy, School of biomedical and health sciences, Victoria University, Werribee campus, Victoria, Australia.

De Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C. et Schrezenmeir J., 2001. Probiotics : compensation for lactase insufficiency, *American Journal of Clinical Nutrition*, **73** : 421–429.

Ding W.K. et Shah N.P., 2007. Acid, Bile, and Heat Tolerance of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria. *Food Microbiology and Safety*, **72 (9)** : 446-450.

Djadouni F., 2013. Evolution de l'activité antimicrobienne des isolats de bactéries lactiques et détermination du spectre d'action de leurs biopeptides vis-à-vis des germes d'altération. Thèse de Doctorat de Microbiologiques Appliquée .Université d'Oran, Faculté des Sciences, Oran, 155p.

Dridjer Dj. et Prévost H., 2009. Bactéries lactiques : Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles, édition ECONOMICA, France.

Ducrotté P., 2011. Microbiote et syndrome de l'intestin irritable. Dossier thématique flore intestinale et probiotiques. La Lettre de l'Hépatogastroentérologue **14 (4)** : 154-159.



Edwards-Ingram L., Gitsham P., Burton N., Warhurst G., Clarke I., Hoyle D., Oliver S.G. et Stateva L., 2007. Genotypic and Physiological Characterization of *Saccharomyces boulardii*, the Probiotic Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **7** : 2458–2467.



FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization), 2001 : *Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.* Cordoba (Argentina)

Fleming H. P., Etchells J. L. et Costilow R. N., 1975. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brins. *Appl. Microbiol.* **30** : 1040-1043.

Fuller, R., 1989. *Probiotics in man and animals.* *J. Appl. Bacteriol.*, **66(5)** : 365-378.



Gálvez A., Abriouel H., López R. L. et Ben Omar N., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, *International Journal of Food Microbiology* **120** : 51–70.

Gilliland S.E., 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews* **87** : 175-188.

Guillouard I., Lim E-M., Van de Guchte M., Grimaldi C., Penaud S., Maguin E., 2004. Tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Le Lait, INRA Ed.* **84 (1-2)** : 1-6.

Guslandi M., Mezzi G., Sorghi M. et al., 2000. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* **45**:1462-1464.



Harms H. K., Bertele-Harms R. M. et Bruer-Kleis D., 1987. Enzyme-substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency, *N Engl J Med* **316** : 1306-1309.

Hastings J.W., Saiier M., Johnson K., Roy I.L.L., Vederas J.C. et Stiles M.E., 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.*, **173(23)** : 7491 -7500.

Heng N. C. K., Wescombe P. A., Burton J. P., Jack R. W. et Tagg J. R., 2007a. The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M. A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag. Berlin Germany. pp 45-92.

Holck A., Axelsson Le., Birkeland S.E., Auht T. et Blom He., 1992. Purification and amino acid sequence of Sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen.Microbiol.*, **138** : 2715-2720.



Ives D.H. et Ikeda S., 1997. Life on the Salvage Path: The Deoxynucleoside Kinases of *Lactobacillus acidophilus* R-2 6 Department of Biochemistry The Ohio State University Columbus, Ohio 43210



Jedidi H., 2007. Effet du stress gastro-intestinal sur la physiologie et le métabolisme des bactéries lactiques et probiotiques. Mémoire de Maître Es-Sciences, Institut de biologie, Université de Tlemcen. Université Laval Québec. 90 pages

Joerger M.C. et Klaenhammer T.R., 1986, Characterization and purification of helveticin I evidence for a chromosomely determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 48 I. *J. Bacteriol.*, **167(2)** : 439-446.

K

Klaenhammer, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70(3)** : 337-349.

Klotz F., 2001. Prise en charge des diarrhées aiguës. *Med. Trop.* **61** : 220-223.

Koebnick C., Wagner I., Leitzmann P., Stern U. et Zunft H.J.F., 2003. Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *Can. J. Gastroenterol.* **17**.

König H., Uden, G. et Frohlich, J., 2009, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, p3 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

L

Letort C. et Juillard V., 2001. Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus* Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, INRA, Jouy-en-Josas, France, *Journal of Applied Microbiology*, **91** : 1023-1029.

M

Mami A., 2013. Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis -à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de Doctorat de Microbiologie Appliquée. Université d'Oran, Faculté des Sciences, Oran, 164p.

Mami A., Henni J-E et Kihal M., 2008. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*, *World Journal of Dairy & Food Sciences* **3 (2)** : 39-49.

Marteau P., Cuillerier E., Meance S., Gerhardt M. F., Myara A., Bouvier M., Bouley C., Tondou F., Bommelaer G. et Grimaud J. C., 2002. *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* **16** : 587-593.

Mishra V. et Prasad D. N., 2005. Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int. J. of Food Microbiol.* **103** : 109-115.

Mohan R., Koebnick C., Schildt J., Schmidt S., Mueller M., Possner M., Radke M. et Blaut M., 2006. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 Supplementation on Intestinal Microbiota of Preterm Infants: a Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study. *Journal of clinical microbiology*, **44** (11) : p. 4025–4031.

Mugula J.K., Narvhus J.A., Sørhaug T., 2003. Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of togwa, a Tanzanian fermented food, *International Journal of Food Microbiology* **83** : 307– 318.

Mulet-Powell N, Lacoste-Armynot A.M., Vinas M. et Simeon de Buochberg M., 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. *J. Food Prot.*, **61**(9) : 1210-1212.

W

Nissen-Meyer J., Holo Ha., Havarstein LS., Sletten K. et Nes I.F., 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.*, **174**(17) : 5686-5692.

Normand M., Roland N., Richoux R., Kerjean J.R., 2006. *Propriétés probiotiques des bactéries propioniques laitières.*

Novel G., 1993. Les bactéries lactiques *in*: Microbiologie industrielle ; les microorganismes d'intérêt industriel. *Technique et Documentation*. Lavoisier (Ed.). 614p.



Pathmakanthan S., KF Li C., Cowie J. et Hawkey C.J., 2004. *Lactobacillus plantarum* 299: Beneficial *in vitro* immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **19** : 166–173.

Pilet M. F., Mográs C. et Federighi M., 2005. Bactéries lactiques. In : Federighi M. Bactériologie Alimentaire. Economica. Paris. pp 219-242.

Piquepaille C., 2013. Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, France.

Pridmore R. D., Berger B., Desiere F., Vilanova D., barretto C., Pittet A.C., Zwahlen M.C., Rouvet M., Altermann E., Barrangou R., Mollet B., Mercenier A., Klaenhammer T., Arigoni F., et Schell M.A., 2003. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533.



Rastall R.A., Gibson G.R., Gill H.S., Guarner F., Klaenhammer T.R., Pot B., Reid G., Rowland I.R. et Sanders M.E., 2005. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health : an overview of enabling science and potential applications, *FEMS Microbiology Ecology*, **52 (2)** : 145–152.

Reid G, Bruce AW., 2005. Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. *World Journal of Urology*. **24** : 28-32.

Reis J. A., Paula A. T., Casarotti S. N. et Penna A. L. B., 2012. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications, *Food Eng Rev* **4**:124–140.

Rönkä E., Malinen E., Saarela M., Rinta-Koski M., Aarnikunnas J., Palva A., 2003. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Food Microbiology* **83** : 63–74.



Sahl A.G. et Bierbaum G., 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **52** : 41-79.

Salminen M.K., Tynkkynen S., Rautelin H., Poussa T., Saxelin M., Ristola M., Valtonen V. et Järvinen A., 2004. The efficacy and safety of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG on prolonged noninfectious diarrhea in HIV patients on antiretroviral therapy : a randomized, placebo-controlled, crossover study. *HIV Clin Trials* **5** : 183-91.

Saris P., Monen T., Reis M. et Sahl H.G., 1996. Immunity to lantibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **69(2)** : 151 - 159.

Sasaki Y., Horiuchi H., Kawashima H., Mukai T. et Yamamoto Y., 2014. NADH Oxidase of *Streptococcus thermophilus* 1131 is Required for the Effective Yogurt Fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* **33** : 31–40.

Schlee M., Wehkamp J., Altenhoefer A., Oelschlaeger T. A., Stange E. F. et Fellermann K., 2007. Induction of Human - Defensin 2 by the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Is Mediated through Flagellin. *Infection and immunity* **75** : 2399–2407.

Schultz M., Veltkamp C., Dieleman L.A., Grenther W.B., Wyrick P.B., Tonkonogy S.L. et Sartor R.B., 2002. *Lactobacillus plantarum* 299v in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis.* **8(2)** : 71-80.

Shankman S., Merrill N. Camien, Block H., Bruce Merrifield R., et Dunn M. S., 1946. Vitamin requirements of twenty-three lactic acid bacteria, Chemical Laboratory, University of California, Los Angeles.

Sheehan M., Vivien Roy D., Sleator Hill C. et Fitzgerald G. F., 2007. Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbiology* **153** : 3563–3571.

Stiles M. E. et Holzapel W. H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *International Journal of Food Microbiology* **36** : 1- 29

Surawicz C. M., 2003. « Probiotics, antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in humans ». *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. **17 (5)** : 775-783.



Tagg J.R., Hjana Am. S. et Wann Pniriker L.W., 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, **40(3)** : 722-756.

Tagg J.R. et McGiven A.R. (1971). Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* **21** : p943.

Tichaczek P.S., Nissen-Meyer J., Nes I.F., Vogel R.F. et Hammes WbP., 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673. *System. Appl. Microbiol.* **15(3)** : 460-468.

Toba T., Yoshioka En. et Itoh T., 1991 a. Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **12(2)** : 43-45.



Upreti G.C. et Hinsdill R.D., 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **7(2)** : 139-145.

V

Vasiljevic T. et Shah N. P., 2008. « Probiotics - From Metchnikoff to bioactives ». *International Dairy Journal*. **18 (7)** : 714-728.

Venema K., Abee T., Haandrikman A.J., Leenhouts K.J., Kok J., Konings W.N. et Venema Ga, 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *App f. Environ. Microbioi.*, **59(4)** : 1041 - 1048.

Vermeiren L., Devlieghere F. et Debevere J., 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products, *International Journal of Food Microbiology* **96** : 149– 164.

W

Wealleans A.L., Litten-Brown J.C., 2010. Effect of supplementing late gestation sows with *Saccharomyces cerevisiae* on piglet growth performance. *Advances in Animal Biosciences*, suppl. Proceedings of the British Society of Animal Science; Cambridge **1(1)** : 186-186.

World Gastroenterology Organisation (WGO), 2008 : *Probiotiques et prébiotiques*. [s.l.]

Y

Yateem A., Balba M.T., Al-Surrayai T., Al-Mutairi B., et Al-Daher R., 2008. Isolation of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential from Camel Milk, *Int. J. of Dairy Sci.* **3(4)** : p194-199.



Annexes

Annexe I : composition des milieux de culture

• Bouillon MRS (TM Media, Inde)

Glucose.....	20 g/l
Peptone.....	10 g/l
Extrait de viande.....	10 g/l
Extrait de levure.....	5 g/l
Acétate de sodium.....	5 g/l
Citrate d'ammonium.....	2 g/l
Phosphate dipotassique.....	2 g/l
Tween 80.....	1 ml
Sulfate de magnésium.....	0,1 g/l
Sulfate de manganèse.....	0,05 g/l

pH du milieu : $6,5 \pm 0,2$.

Stériliser par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

• Gélose MRS (CONDA, Espagne)

Glucose.....	20 g/l
Peptone.....	10 g/l
Extrait de viande.....	8 g/l
Extrait de levure.....	4 g/l
Acétate de sodium.....	5 g/l
Citrate d'ammonium.....	2 g/l
Phosphate dipotassique.....	2 g/l
Tween 80.....	1 ml
Sulfate de magnésium.....	0,2 g/l
Sulfate de manganèse.....	0,05 g/l
Agar.....	10 g/l

pH du milieu : $6,2 \pm 0,2$.

Stériliser par autoclavage à 120°C pendant 12 min.

- **Bouillon Nutritif (Diagnostici Liofilchem, Italie)**

Extrait de viande.....1 g/l

Extrait de levure.....2 g/l

Peptone.....5 g/l

Chloride de sodium.....5 g/l

pH du milieu : $6,8 \pm 0,2$

Stériliser par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

- **Gélose Nutritive (TM Media, Inde)**

Extrait de viande.....1,5 g/l

Extrait de levure.....1,5 g/l

Peptone.....5 g/l

Chloride de sodium.....5 g/l

Agar.....15 g/l

pH du milieu : $7,4 \pm 0,2$

Stériliser par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

Annexe II : Résultats obtenus

Tableau I : Résultats du test des spots

Souche	Diamètre d'inhibition (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
souche 11	28	35
souche 12	26	36
souche 52	25	31
souche 35	0	0
souche 19	27	33
souche 23	24	31
souche 38	27	29
souche 21	0	0
souche 31	26	33
souche 34	26	32
souche 28	27	32
souche 6	27	26
souche 13	29	34
souche 50	0	27
souche 48	24	33
souche 14	0	28
souche 9	0	0
souche 2	24	31
souche 17	20	25
souche 25	21	25
souche 22	32	27
souche 18	31	32
souche 32	26	27
souche 24	21	25
souche 4	12	26
souche 8	28	28
souche 16	29	22
souche 5	28	29
souche 45	0	0
souche 29	22	23
souche 40	33	23

Tableau II : Résultats du test des puits

Souche	Diamètre d'inhibition (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
souche 11	16,5	14
souche 12	14	17
souche 52	17	14
souche 19	16	13
souche 23	0	14
souche 38	14	15
souche 31	17	13
souche 34	16	13,5
souche 28	15	15
souche 6	0	15
souche 13	18	16
souche 48	15,5	15
souche 2	19	15
souche 17	10	0
souche 25	18	15
souche 22	15,5	14
souche 18	17	14
souche 32	18,5	15
souche 24	17	13,5
souche 4	16	13,5
souche 8	17	14
souche 16	16,2	14
souche 5	15,5	14
souche 29	17	14,5
souche 40	0	0

Tableau III : Résultats du test de l'effet du pH

Souche	pH		
	pH 3	pH 4	pH 5
souche 11	+++	+++	++
souche 12	+++	+++	++
souche 52	++	++	++
souche 19	+++	++	++
souche 38	+++	+++	++
souche 31	+++	++	++
souche 34	++	++	++
souche 28	+++	+++	++
souche 13	++	++	+
souche 48	++	++	++
souche 2	+++	+++	++
souche 25	++	++	++
souche 22	+++	+++	++
souche 18	++	++	++
souche 32	+++	+++	++
souche 24	+++	+++	++
souche 4	+++	+++	++
souche 8	+++	++	++
souche 16	+++	+++	++
souche 5	+++	+++	++
souche 29	+++	+++	++

+++ : Croissance bonne

++ : Croissance moyenne

+ : Croissance faible

Tableau IV : Résultats du test de l'effet des sels biliaires

Souche	Concentration de sels biliaires					
	SB 0,5%	SB 1%	SB 1,5%	SB 2%	SB 2,5%	SB 3%
souche 11	-	-	-	-	-	-
souche 12	+	+	+	-	-	-
souche 19	+	+	+	+	+	+
souche 38	-	-	-	-	-	-
souche 31	+	+	+	-	-	-
souche 28	-	-	-	-	-	-
souche 2	-	-	-	-	-	-
souche 22	+	+	+	-	-	-
souche 32	-	-	-	-	-	-
souche 24	-	-	-	-	-	-
souche 4	-	-	-	-	-	-
souche 8	+	-	-	-	-	-
souche 16	-	-	-	-	-	-
souche 5	-	-	-	-	-	-
souche 29	+	-	-	-	-	-

+ : Croissance positive

- : Croissance négative

Tableau V : Résultats du test de l'effet de la trypsine

Souche	Concentration de sels biliaires utilisée					
	SB 0,5%	SB 1%	SB 1,5%	SB 2%	SB 2,5%	SB 3%
souche 12	S	S	S			
souche 19	R	R	R	R	R	R
souche 31	S	S	S			
souche 22	S	S	S			
souche 8	S					
souche 29	S					

R : Résistante **S** : Sensible

Tableau VI : Résultats du test de l'effet de la pepsine

Souche	Concentration de sels biliaires utilisée					
	SB 0,5%	SB 1%	SB 1,5%	SB 2%	SB 2,5%	SB 3%
souche 12	S	S	S			
souche 19	R	R	R	R	R	R
souche 31	S	S	S			
souche 22	S	S	S			
souche 8	S					
souche 29	S					

R : Résistante **S** : Sensible

Annexe III : Préparation des tampons enzymatiques

Préparation de 100 ml de tampon phosphate de sodium à 0,2 M et à pH

7 :

1-peser 2,83 g de Na_2HPO_4 et 2,39 g de NaH_2PO_4 .

2-dissoudre chacun des deux réactifs dans 50 ml d'eau distillée.

3-ajuster le volume de chacune des deux solutions à 100 ml en ajoutant de l'eau distillée.

4-mélanger 77 ml de la solution de Na_2HPO_4 et 23 ml de la solution de NaH_2PO_4 .

5-une fois le mélange obtenu, mesurer le pH et, si nécessaire, l'ajuster par ajout de HCl ou de NaOH.

Préparation de 100 ml de tampon Glycine/HCl à 0,1 M et à pH 3 :

1-peser 1,5 g de glycine.

2-diluer 100 μl de HCl dans 100 ml d'eau distillée.

3-mélanger les deux composants (faire dissoudre la glycine dans le HCl).

4-une fois le mélange obtenu, mesurer le pH et, si nécessaire, l'ajuster par ajout de HCl ou de NaOH

Résumé :

But : Etude des propriétés probiotiques de souches de bactéries lactiques d'origine locale

Matériel et méthodes : Cinq tests ont été réalisés sur les souches : test des spots, test des puits, test de résistance au pH, test de résistance aux sels biliaires et test de résistance aux enzymes digestives.

Résultats obtenus : Les souches 2, 4, 5, 6, 12, 19, 21, 22, 29, 31 ont montré des résultats remarquables, mais après les derniers tests, seule la souche 19 a révélé un potentiel probiotique.

Conclusion : Parmi les souches de bactéries lactiques étudiées, il n'y a que la souche 19 qui peut être utilisée comme probiotique.

Mots-clés : probiotique, bactérie lactique, fromage artisanal.

Summary :

Aim : Study of probiotic properties of local originated lactic acid bacteria strains.

Material and Methods : Five tests have been realised to the strains : spot test, well test, acid tolerance test, bile salt tolerance test and digestive enzyme tolerance test.

Results and discussion : The strains 2, 4, 5, 6, 12, 19, 21, 22, 29, 31 have shown remarkable results, but after last tests, only the strain 19 has shown a probiotic potential.

Conclusion: From the lactic acid bacteria strains, only the strain 19 that can be used as a probiotic.

Key words : probiotic, lactic acid bacteria, traditional cheese.